Vorkommen, Biogenese und Bedeutung von γ-Glutamylderivaten in *Agaricus bisporus*

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der
Universität Zürich

von

HANS STÜSSI
aus Dänikon (ZH)

Begutachtet von Frau Prof. Dr. D. Rast

Juris Druck + Verlag Zürich
1979

Vorkommen, Biogenese und Bedeutung von γ-Glutamylderivaten in *Agaricus bisporus*

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der
Universität Zürich

von

HANS STÜSSI
aus Dänikon (ZH)

Begutachtet von Frau Prof. Dr. D. Rast

Juris Druck + Verlag Zürich
1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

ISBN 3 260 04608 9

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung 5

II. Material und Methoden 9

III. Experimentelle Ergebnisse 25

1. Identität einiger γ-Glutamylderivate von A. bisporus 25
   - 1.1. γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol 25
   - 1.2. γ-L-Glutaminyl-3,4-benzochinon 29
   - 1.3. γ-L-Glutaminyl-3,4-dihydroxybenzol 33
   - 1.4. Pyrrolidoncarbonsäure 37
2. Der Stoffwechsel von γ-Glutamylderivaten in A. bisporus 40
   - 2.1. Biogenese von γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol 40
   - 2.2. Biogenese von Pyrrolidoncarbonsäure 43
   - 2.3. Enzyme des γ-Glutamylzyklus 45
3. Vorkommen und Biogenese von Melanin in A. bisporus 46
   - 3.1. Melanin: eine Sporenwandkomponente 47
   - 3.2. Die Phenoloxidasen der Sporen 49
   - 3.3. In vitro Synthese von Melanin aus γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol unter Verwendung von Phenoloxidase aus A. bisporus 51
   - 3.4. Vergleich von nativem und synthetischem Champignonmelanin 52

IV. Schlussfolgerungen und Diskussion 54

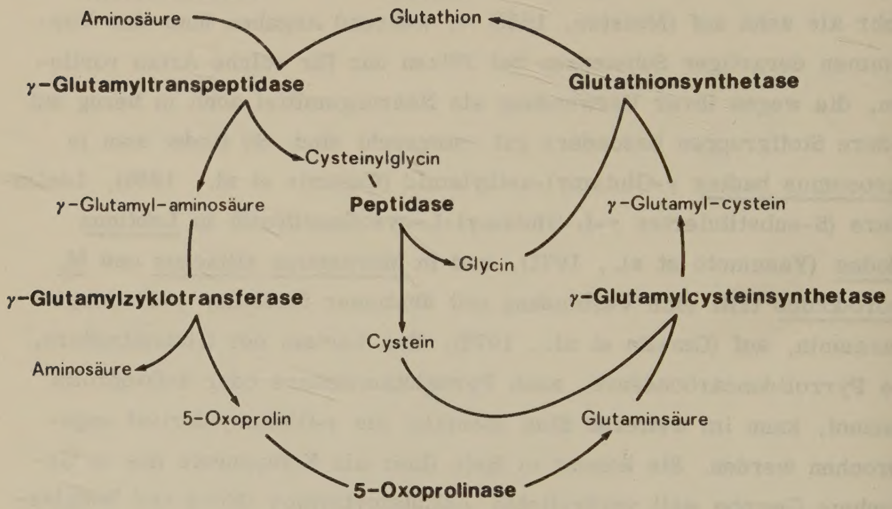
V. Zusammenfassung 63

VI. Literaturverzeichnis 66

I. EINLEITUNG

γ-Glutamylderivate sind insbesondere bei höheren Pflanzen verbreitet - allein in verschiedenen Spezies von Allium sowie in Lunaria annua treten mehr als zehn auf (Meister, 1965) -, während Angaben über das Vorkommen derartiger Substanzen bei Pilzen nur für solche Arten vorliegen, die wegen ihrer Verwendung als Nahrungsmittel auch in bezug auf andere Stoffgruppen besonders gut untersucht sind. So findet man in Xerocomus badius γ-Glutamyl-aethylamid (Casimir et al., 1960), Lentinsäure (S-substituiertes γ-L-Glutamyl-L-cysteinsulfoxid) in Lentinus edodes (Yasumoto et al., 1971), und in Marasmius alliaceus und M. scorodonius tritt eine Verbindung mit ähnlicher Struktur, γ-Glutamylmarasmin, auf (Gmelin et al., 1976). Das Lactam der Glutaminsäure, die Pyrrolidoncarbonsäure, auch Pyroglutaminsäure oder 5-Oxoprolin genannt, kann im weiteren Sinn ebenfalls als γ-Glutamylderivat angesprochen werden. Sie kommt in Hefe (hier als Komponente des in tierischem Gewebe weit verbreiteten γ-Glutamylzyklus (Mooz und Wigglesworth, 1976; Meister und Tate, 1976) bekannt: s. unten) und in verschiedenen Basidiomyceten (Touzé-Soulet und Montant, 1957), worunter auch in Agaricus campestris, vor, hier in Form von Pyroglutamyl-Dipeptiden (Altamura et al., 1970). Aus nahen Verwandten dieses Champignons wurden diverse aromatische γ-Glutamylderivate isoliert: Jadot et al. (1960) wiesen erstmals p-Hydroxy-(γ-L-glutamyl)-anilid in Agaricus hortensis nach, von welcher Substanz Heinemann und Casimir (1961) zeigten, dass sie für die Gattung Agaricus typisch ist. Die gleiche phenolische Verbindung wurde von Weaver et al. (1971a) aus Lamellen von A. bisporus extrahiert, als erstmals beschrieben erklärt und mit γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol benannt. Aus wässerigen Extrakten dieses Pilzes kann auch ein Oxidationsprodukt dieser Substanz, γ-L-Glutaminyl-3,4-benzochinon, gewonnen werden (Weaver et al., 1971b). Schliesslich tritt im gleichen Organismus β-N-(γ-L-Glutamyl)-4-hydroxymethylphenylhydrazin, mit dem Trivialnamen Agaritin bezeichnet, auf (Levenberg, 1961).

Am Stoffwechsel der γ-Glutamylderivate sind vor allem die Enzyme des insbesondere aus tierischem Gewebe und aus Hefe bekannten γ-Glutamylzyklus beteiligt:



Der γ-Glutamylzyklus
(s. Meister und Tate, 1976; Mooz und Wigglesworth, 1976)

Das Schlüsselenzym des γ-Glutamylzyklus, die γ-Glutamyltranspeptidase, auch γ-Glutamyltransferase genannt (EC 2.3.2.2), überträgt von einem γ-Glutamylderivat, z.B. Glutathion, den Glutamylrest auf einen geeigneten Akzeptor (Aminosäure, Peptid, Wasser). Das Enzym ist bei höheren Pflanzen weit verbreitet (Thompson et al., 1964) und findet sich auch bei den Basidiomyceten L. edodes, Tricholoma shimeji (Iwami et al., 1975), M. scorodonius und M. alliaceus (Gmelin et al., 1976).

Eine γ-Glutamyltransferase mit besonderen Eigenschaften haben Gigliotti und Levenberg (1964) aus fünf Arten von Agaricus, die alle Agaritin (s. oben) enthalten, isoliert und charakterisiert. Die Substrate des Enzyms, aromatische Hydrazine und ihre γ-Glutamylderivate, können als Glutamylakzeptoren bzw. -donatoren fungieren; das Enzym be-

sitzt auch Hydrolaseaktivität (Transfer des γ-Glutamylrestes auf Wasser). In diesem Zusammenhang sprechen die Autoren auch von einem - allerdings nicht näher definierten - "metabolic shuttle" für Glutamylreste zwischen Agaritin und γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol. Von den zwei Hauptmöglichkeiten zur Biosynthese des Benzolringes (in aromatischen Glutamylderivaten), Kondensation und anschliessende Zyklisierung von Acetat- oder Malonat-Einheiten resp. Aromatisierung von Shikimisäure beinhaltend, ist bei der Vielzahl von aromatischen Pilzmetaboliten vor allem der - allerdings fast ausschliesslich auf Fungi imperfecti beschränkte - Acetat/Malonat-Weg (Polyketid-Biosynthese) verwirklicht (vgl. Turner, 1971). Der Shikimisäure-Weg, ausgehend von Phosphoenolpyruvat und D-Erythrose-4-phosphat, führt bekanntlich über die Intermediärprodukte 5-Dehydroshikimisäure, Shikimisäure und Chorisminsäure zum Benzolring und den Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan und liefert Ausgangsstoffe zur Synthese gewisser Pilzaromate. So ist z.B. 5-Dehydroshikimisäure die Vorstufe für Protokatechusäure und Gallussäure in Phycomyces blakesleeanus (Haslam et al., 1961), und von der aus Chorisminsäure und Glutamin gebildeten p-Aminobenzoesäure wird vermutet, dass sie der Präkursor von N-Methylnitrosaminobenzaldehyd in Clitocybe suaveolus sowie von p-Hydroxy-methyldiazonium-Ion und somit Agaritin in A. bisporus ist (Towers, 1976).

Die γ-Glutamylderivate im tierischen Gewebe sind Intermediärprodukte des γ-Glutamylzyklus, dem eine wichtige Funktion im Aminosäuretransport durch Zellmembranen zugesprochen wird (Meister, 1973), eine Hypothese, die u.a. auf der Beobachtung gründet, dass die γ-Glutamyltranspeptidase dort stets membrangebunden auftritt und eine breite Akzeptorspezifität aufweist. Bei den höheren Pflanzen spielen die Glutamylderivate möglicherweise eine andere Rolle, da das Enzym nicht mit Zellmembranen assoziiert zu sein scheint. Nach Mooz und Wigglesworth (1976) liegt allerdings vermutlich auch bei Hefe eine Aminosäuretranslokation via Glutamylzyklus vor. Eine speziellere Funktion von γ-Glutamyltransferase, die Freisetzung von typischen Aromastoffen aus nichtflüchtigen S-haltigen γ-Glutamylderivaten, ist von Marasmius (Gmelin

et al., 1976) und L. edodes (Yasumoto et al., 1971) bekannt. Von γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol und/oder γ-L-Glutaminyl-3,4-benzochinon wird angenommen, dass sie in Sporen von A. bisporus die Keimruhe induzieren (Vogel und Weaver, 1972; Vogel et al., 1974). Diese Spekulation beruht auf den Beobachtungen, dass γ-L-Glutaminyl-3,4-benzochinon in Mitochondrien aus Rattenleber die Succinatdehydrogenase hemmt (Weaver et al., 1972), und dass die Succinatdehydrogenaseaktivität von aus jungen Champignons isolierten Mitochondrien herabgesetzt wird durch die stark farbigen, γ-L-Glutaminyl-3,4-benzochinon enthaltenden Ueberstände von Lamellen älterer Fruchtkörper, wobei der Effekt sich mit zunehmendem Alter der extrahierten Sporokarpen akzentuiert (Vogel und Weaver, 1972). γ-L-Glutaminyl-3,4-benzochinon und ein weiteres, nicht identifiziertes Oxidationsprodukt von γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol zeigen zudem antibakterielle Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Spezies und hemmen die RNA-Polymerase von E. coli (Vogel et al., 1974).

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, das Vorkommen von γ-Glutamylderivaten in verschiedenen Entwicklungszuständen und die quantitative Verteilung dieser Stoffe im sporulierenden Fruchtkörper von A. bisporus zu analysieren, die Aktivität einzelner Enzyme des γ-Glutamylzyklus zu untersuchen sowie die Biogenese von γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol, insbesondere seines aromatischen Ringes, aufzuklären. Darüber hinaus sollen bereits bestehende Hypothesen zur physiologischen Rolle von γ-Glutamylderivaten in A. bisporus anhand der erhaltenen Resultate überprüft und allenfalls neue aufgestellt werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Pilzmaterial

Die Untersuchungen wurden mit Agaricus bisporus (Lange) Sing., Stämme A-4 und A-6 (Hauser, Champignonkulturen AG, Gossau (ZH)), durchgeführt.

1.1. Sporen

Die Gewinnung von Champignonsporen erfolgte nach dem von Rast (1965) beschriebenen Verfahren.

1.2. Mycelium

Für die Anzucht von Mycelium fanden folgende Medien Verwendung:

a) Kartoffel/Glucose-Lösung (1% Glucose; 0,05% Hefeextrakt)

b) Vollmedium (2% Pepton; 1% Hefeextrakt; 1% Glucose; 0,2% Tween 80); vgl. Dütsch et al. (1979)

c) Kurzkompostierter Pferdedung auf Weizenstrohbasis
Die Gewinnung von kompostfreiem Mycelium erfolgte nach der durch Häsler-Küng und Rast (1974) leicht modifizierten Methode von Holtz und Schisler (1971): Ein Plexiglasgefäss (50 x 50 x 20 cm) wurde 7 cm hoch mit bespicktem Kompost gefüllt, dieser mit einem Nylonnetz bedeckt und mit einer Lage (2 cm) von Glasperlen (3 cm Ø) überschichtet; nach Zugabe eines zweiten Netzes wurde eine Schicht (7 cm) von unbeimpftem Kompost hinzugefügt. Die Isolation des Myceliums aus der Zwischenschicht erfolgte entweder unmittelbar vor oder kurz nach der Fruktifikation.

Das Inokulum bestand aus einer Suspension gekeimter Sporen (Rast und Stäuble, 1970) für die Flüssigmedien, oder aus Körnerbrut für die Kompostkulturen (vgl. Stäuble, 1972). Kulturbedingungen waren folgende: 24^{o} im Brutschrank (a); 28^{o} im Konstantraum auf einer Rotationsschüttel-

maschine (f = 85.min^{-1}) (b); 24^{o} und 95% RLF in einer Klimakammer (Karl Weiss, Giessen, Typ 7,0 E/+5JU-PK) für Mycelwachstum und 18^{o}, 95% RLF, zusätzliche Belüftung (180 m^{3}/h) für Fruktifikation und Fruchtkörperwachstum.

1.3. Fruchtkörper

Die Anzucht erfolgte wie unter II.1.2. beschrieben, jedoch ohne Glasperlenschicht und Nylonnetze.

2. Applikation von Tracern

2.1. Fütterung von Mycelium mit 2-^{14}C-Acetat

Hierzu wurden Flüssigkulturen (Kartoffelextrakt mit 1% Glucose: vgl. II.1.2.) verwendet. Sobald die ersten "Inseln" von Luftmycel auftraten (nach ca. 3 Wochen), spritzte man durch den Wattestopfen 5 μCi (0,085 μMol) 2-^{14}C-Natriumacetat in die "Lakunen". Nach 4 Tagen wurde das Mycelium abgenutscht und zur Entfernung von nicht metabolisiertem ^{14}C-Acetat mehrmals mit Wasser gewaschen. Die Weiterverarbeitung erfolgte gemäss II.6.2.

2.2. Fütterung von intakten Fruchtkörpern

Sporokarpen mit einem Hutdurchmesser von 15 mm wurden mit dem Stiel in die Fütterlösung (0,3 ml/Fruchtkörper) gestellt. Die Objekte standen in einer weitgehend wasserdampfgesättigten Kammer (vgl. Dütsch, 1971); während der 24 h dauernden Fütterung konnten eine starke Streckung des Stieles und ein Aufreissen des Velums beobachtet werden. Die vom Fruchtkörper schon nach wenigen Stunden aufgenommene Tracerlösung wurde mehrmals durch Wasser ersetzt, wodurch ein praktisch vollständiges "Hineinwaschen" des Präkursors gewährleistet wurde. Für die Weiterverarbeitung der Fruchtkörper s. II.3.3.

3. Isolation und quantitative Bestimmung von γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol (GHB)

3.1. Aus Sporen

2 g Sporen wurden in einer Zellmühle (Bühler Vibrator Vi2) mit 20 g Glaskugeln (Ø = 0,5 mm) und 15 ml HCl 0,1 n während 60 min bei 2^{o} aufgebrochen. Anschliessend zentrifugierte man das Homogenat während 20 min bei 15000 g, schlämmte das Sediment zweimal mit 20 ml HCl 0,1 n auf, zentrifugierte erneut und brachte die drei vereinigten Extrakte im Vakuum-Rotationsverdampfer bei 40^{o} zur Trockene. Der Rückstand wurde in 10 ml Wasser gelöst, zentrifugiert (wie oben) und der klare Ueberstand auf eine Sephadex G-25 (fine)-Säule (2,5 x 90 cm) aufgetragen und die Substanz mit Wasser eluiert (Durchlaufgeschwindigkeit: 2,5 ml/min). Das Eluat wurde bei 245 nm (λ_{max} von GHB) mittels Durchflussküvette im UV-Photometer (Hitachi 101) gemessen und mit einem Fraktionenkollektor (LKB Ultrorac 7000) in Volumina von 5 ml gesammelt. Durch Addition von Tyrosinase zu den einzelnen Fraktionen konnten anhand der dabei auftretenden Rotfärbung (s. II.7.2.) die phenolischen Gipfel identifiziert werden; die Ueberprüfung der Reinheit erfolgte dünnschichtchromatographisch (vgl. II.13.1., Laufmittel C) und durch Aufnahme des UV-Spektrums (vgl. II.17.). Die GHB-Fraktionen (Elutionsvolumen 540-620 ml) wurden anschliessend vereinigt, die Extinktionswerte bei 245 nm bestimmt und daraus mittels einer aus synthetischem GHB (s. II.7.1.) erstellten Eichkurve die Konzentration des Phenols berechnet.

3.2. Aus Mycelium und Fruchtkörpern

Man mörserte das Material in flüssigem Stickstoff und homogenisierte anschliessend in einem Sorvall Omni-Mixer mit Salzsäure 0,1 n (5 ml/g FG) während 2 min bei 0^{o}. Die Weiterverarbeitung erfolgte gemäss II.3.1.

3.3. Aus Fruchtkörpern nach Applikation von Tracern

Die Herstellung der Extrakte erfolgte wie in II.3.1. und II.3.2. beschrieben, jedoch wurde vor der Chromatographie an Sephadex ein weiterer Reinigungsschritt eingeführt. Der klare Extrakt wurde auf eine Säule mit 25 ml Kationenaustauscher (Dowex 50W-X8, H^+-Form) gegeben und nach der Abtrennung der Neutral- und Säurefraktion durch Spülen mit 700 ml Wasser die Aminosäurefraktion mit 500 ml HCl 2 n eluiert. Die Salzsäure wurde im Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in 10 ml Wasser gelöst und an einer Sephadex-Säule wie oben beschrieben aufgetrennt.

4. Isolation und quantitative Bestimmung von γ-L-Glutaminyl-3,4-dihydroxybenzol (GDHB)

100 g Lamellenmaterial von Fruchtkörpern mit offenem Velum wurde mit 500 ml HCl 0,1 n im Sorvall Omni-Mixer bei 0^o zerkleinert, das Homogenat bei 15000 g während 20 min zentrifugiert und der Ueberstand bei 40^o im Vakuum zur Trockene eingedampft. Den Rückstand löste man in 20 ml Wasser, gab ihn auf eine Säule mit 100 ml Kationenaustauscher (Dowex 50W-X8, H^+-Form), spülte mit 2000 ml Wasser und eluierte anschliessend die Aminosäuren mit 1500 ml HCl 2 n. Das Eluat wurde zur Trockene eingeengt (wie oben beschrieben), der Rückstand in 20 ml Wasser gelöst und an einer Sephadex G-25 (fine)-Säule (2,5 x 90 cm) chromatographiert (vgl. II.3.1.). Die einem Elutionsvolumen von 650-740 ml entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, auf ca. 10 ml eingeengt und erneut an Sephadex G-25 gereinigt. Die dünnschichtchromatographisch reinen Fraktionen (vgl. II.13.1., Laufmittel A, B, C) wurden vereinigt, zur Trockene eingedampft und im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet. Während des ganzen Isolationsvorganges wurde wenn immer möglich unter Stickstoff gearbeitet. Nach dem obigen Verfahren konnten 5,6 mg eines rötlichen, glänzenden Pulvers isoliert werden, welches für die Strukturabklärung Verwendung fand. Für die quantitative Bestimmung des

Phenols aus Mycelium und Fruchtkörper wurde die Extraktion und Isolation ausgeführt wie für GHB in II. 3. 1. und II. 3. 2. beschrieben. Zur Berechnung der GDHB-Konzentrationen diente der molare Extinktionskoeffizient von 9670 bei 248 nm (Szent-Gyorgyi et al., 1976).

5. Semiquantitative Bestimmung von γ-L-Glutaminyl-3,4-benzochinon (GBQ)

5.1. Aus Sporen

0,55 g Sporen (= 0,5 g TG) wurden bei 2^o mit 10 g Glasperlen (Ø = 0,5 mm) und 10 ml Wasser während 20 min in der Zellmühle aufgeschlagen. Nach dem Zentrifugieren (48000 g, 10 min, 2^o) wurde der Ueberstand im Kühllabor sofort auf eine Sephadex-Säule aufgetragen, mit Wasser von 4^o mit 2,5 ml/min eluiert und das Elutionsprofil registriert (vgl. II. 3. 1.). Die Hauptfraktionen des GBQ-Gipfels (Elutionsvolumen ca. 480-520 ml) vereinigte man, stellte auf ein Volumen von 50 ml und bestimmte die Absorption bei 490 nm.

5.2. Aus Fruchtkörpern

Verschiedene Teile (jeweils 5 g = 0,5 g TG) eines sporulierenden Fruchtkörpers wurden in 25 ml Wasser im Sorvall Omni-Mixer bei 0^o während 2 min zerkleinert und die Homogenate gemäss II. 5. 1. weiter verarbeitet und analysiert.

5.3. Aus Fruchtkörpern nach in vivo Hemmung der Tyrosinase

In einem 250 ml Sulfierkolben mit Planschliff, verbunden mit einem Gasentwicklungsgefäss und -absorptionsflaschen wurde ein frisch gepflückter, sporulierender Fruchtkörper (Hutdurchmesser ca. 60 mm) gegeben und dann die Vorrichtung auf 40 mm Hg evakuiert. Anschliessend wurden 220 ml HCN (hergestellt durch Zutropfen von 2 ml H_2SO_4 10 n zu einer

10 m NaCN-Lösung bei 60°) und N_2 bis zum Druckausgleich eingesogen. Den Fruchtkörper inkubierte man in der so gebildeten ca. 80% HCN-Atmosphäre bei Zimmertemperatur während 30 min. Dann wurde die Apparatur während 15 min mit N_2 gespült und dabei überschüssiges HCN in 2 Waschflaschen mit je 50 ml NaOH aufgefangen. Die Weiterverarbeitung des Fruchtkörpers erfolgte wie in II. 5. 1. und II. 5. 2. beschrieben.

6. Isolation der nichtflüchtigen organischen Säuren

6.1. Aus Sporen

1 g Sporen wurden in einer Zellmühle mit 15 g Glaskugeln (Ø = 0,5 mm) und 10 ml Salzsäure 0,1 n aufgebrochen. Anschliessend zentrifugierte man den Extrakt während 15 min bei 12000 g, schlämmte das Sediment mit 10 ml Wasser auf und zentrifugierte erneut. Die beiden so erhaltenen Extrakte wurden vereinigt und im Vakuum-Rotationsverdampfer bei 40° auf wenige ml eingeengt. Die Auftrennung des Extraktes in Neutralfraktion, Aminosäuren und nichtflüchtige organische Säuren erfolgte an zwei hintereinandergeschalteten Säulen (Ø = 16 mm) mit je 40 ml stark saurem Kationenaustauscher (Dowex 50W-X8, H^+-Form) resp. stark basischem Anionenaustauscher (Dowex 1-X8, Formiat-Form). Das Umladen des Ionenaustauschers Dowex-1 von der Chlorid- in die Formiatform wurde mit Natriumformiat 1 m und Ameisensäure 0,1 n durchgeführt. Die aus dem Anionenaustauscher mit 500 ml Ameisensäure 4 n eluierte Fraktion der organischen Säuren brachte man im Rotationsverdampfer zur Trockene und bewahrte den Rückstand bis zur Weiterverarbeitung bei -18° auf.

6.2. Aus Mycelium

Das Mycelium wurde durch Abnutschen vom Nährmedium (Kartoffelextrakt mit 1% Glucose, vgl. II. 1. 2.) getrennt und mit 30 ml heissem abs. Aethylalkohol im Sorvall Omni-Mixer zerkleinert. Das Homogenat zentrifugierte man (10 min, 5000 g) und wusch das Sediment, unter nachfol-

gender Zentrifugation, 2 x mit Aethylalkohol 80%. Die drei so erhaltenen Ueberstände wurden vereinigt und auf 10 ml eingeengt. Die Fraktionierung des Extraktes erfolgte wie unter 6.1. beschrieben.

6.3. Aus Fruchtkörpern

Jeweils 25 g Pilze spülte man mit Wasser und stellte dann 2-3 mm dicke Schnitte her. Diese wurden mit 150 ml heissem abs. Aethylalkohol im Sorvall Omni-Mixer homogenisiert. Die Weiterverarbeitung erfolgte gemäss II.6.1. und II.6.2.

7. Synthese von γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol (GHB) und γ-L-Glutaminyl-3,4-benzochinon (GBQ)

7.1. GHB

Die Synthese dieser Verbindung erfolgte nach dem leicht modifizierten Verfahren von Weaver et al. (1971a): Die Vorstufe p-Benzyloxy-anilin (sog. Inhibitor Präkursor I) ist im Handel (Fluka) erhältlich; die Substanz mit dem Reinheitsgrad purum wurde nach zweimaliger Umkristallisation aus Hexan für die Synthese eingesetzt.

7.2. GBQ

0,5 mg synthetisches GHB (vgl. II.7.1.) wurde in 1,0 ml Phosphatpuffer (0,05 m, pH 6,8) gelöst und mit 0,2 mg Tyrosinase (800 U) während 60 min bei Zimmertemperatur inkubiert, die rote Lösung anschliessend auf eine Sephadex G-25 (fine)-Säule (1 x 30 cm) aufgetragen und bei 4^{o} mit Wasser eluiert. Die Identifikation des roten GBQ erfolgte durch Vergleich des UV-Spektrums in Wasser mit Angaben von Weaver et al. (1971b) (λ_{max} 272 und 490 nm; $A_{272} : A_{490} = 3,4$).

8. Isolation, Synthese und Abbau von Melanin

8.1. Isolation von Sporenwandmelanin

Die Isolation von Melanin aus der Champignonsporenwand erfolgte nach der von Piattelli et al. (1965) für Ustilago maydis beschriebenen Methode. Bei diesem Verfahren wurden aus Sporen (5 g) durch mehrwöchige, intensive Extraktion mit organischen Lösungsmitteln und Salzsäure alle Zellbestandteile mit Ausnahme des unlöslichen Melanins entfernt.

8.2. Synthese von Melanin aus γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol (GHB)

300 mg synthetisches GHB (vgl. II.7.1.) wurden in 300 ml Phosphatpuffer (0,05 m, pH 6,8) gelöst, 5 mg "mushroom tyrosinase" (Sigma; 4000 U/mg) zugegeben und unter Einleitung von Luft während 30 h bei Zimmertemperatur gerührt. Die braunschwarze Lösung wurde zentrifugiert (10000 g, 20 min), der Ueberstand mit HCl 1 n angesäuert und der schwarze Niederschlag durch Zentrifugation (10000 g, 20 min) gesammelt. Man wusch das Sediment, unter nachfolgender Zentrifugation, 3 x mit HCl 0,1 n und extrahierte es anschliessend während 120 h mit HCl 20% unter Rückfluss. Dann wurde das Pigment in einem Glasfiltertrichter (G4) von der Salzsäure getrennt, der Filterrückstand 10 x mit HCl 5% und 20 x mit Wasser gewaschen und im Vakuum bei 80° über P_2O_5 während 48 h getrocknet.

8.3. Alkalischmelze

Die Melanindegradation durch Alkalischmelze erfolgte nach der leicht modifizierten Methode von Nicolaus et al. (1964). Melanin (5 mg), NaOH (50 mg), KOH (50 mg) und $Na_2S_2O_4$ (1 mg) wurden in einem Achatmörser gut durchgemischt und im Platintiegel während 20 min auf 320° erhitzt. Die Schmelze wurde abgekühlt, in 5 ml $Na_2S_2O_4$ 2% aufgenommen und mit Eisessig angesäuert. Nach der Zentrifugation (15000 g, 20 min) schüttelte man den gelben Ueberstand mit 4 x 5 ml Aether aus, extra-

hierte die vereinigten Aetherfraktionen 2 x mit 5 ml ges. $NaHCO_3$ und 1 x mit 2 ml Wasser. Die Aetherphase wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht und der Rückstand in 50 μl Aethanol abs. gelöst (Fraktion 1). Die $NaHCO_3$-Lösung wurde mit HCl conc. angesäuert, mit 4 x 5 ml Aether ausgeschüttelt, die Aetherphase zur Trockene eingedampft und der Rückstand in 50 μl Aethanol abs. aufgenommen (Fraktion 2). Die Fraktionen 1 und 2 wurden für die dünnschichtchromatographischen Analysen verwendet (Laufmittel D, E, vgl. II.13.1.).

8.4. Oxidation mit Kaliumpermanganat

Diese wurde gemäss den Angaben von Hackman und Goldberg (1971) ausgeführt. Dabei oxidiert man die basische Melaninlösung mit $KMnO_4$-Lösung; die anfallenden Oxidationsprodukte werden mit Aether extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie analysiert (für Laufmittel und Sprühreagenzien vgl. II.13.1.).

9. Herstellung von Enzymrohextrakten

9.1. Aus Sporen

9.1.1. Herstellung des Rohextraktes für die spektrophotometrische Bestimmung von Tyrosinase (Phenolase)

Es gelangte die Methode von Demoulin (1967) zur Anwendung. Sporen (1,0 g) wurden bei 2^o mit 15 g Glaskugeln (Ø = 0,5 mm) in 10 ml Aethanol 95% während 40 min aufgeschlagen. Nach der Zentrifugation suspendierte man den Rückstand in 35 ml Wasser und schüttelte ihn während 60 min im Kühlraum. Dann wurde zentrifugiert (9000 g, 15 min), der Ueberstand mit 50 ml Aceton versetzt und nach einer weiteren Zentrifugation (9000 g, 10 min) das Sediment in 2,5 ml Phosphatpuffer (0,05 m, pH 6,8) aufgenommen. Nach der anschliessenden Zentrifugation wurde der Ueberstand für die Analysen im Eisbad aufbewahrt.

9.1.2. Herstellung des Rohextraktes für gelelektrophoretische Untersuchungen

1 g Sporen wurden mit der Zellmühle aufgebrochen (vgl. II.9.1.1.). Das Homogenat zentrifugierte man (9000 g, 15 min), suspendierte den Rückstand in 2 ml Wasser und rührte ihn mit einem Magnetrührstab während 60 min im Kühllabor. Nach Zentrifugation der Suspension (9000 g, 15 min) wurde der Ueberstand sofort analysiert.

9.2. Aus Fruchtkörpern

Fruchtkörpermaterial (10 g) wurde mit 10 ml Tris/HCl-Puffer (0,05 m, pH 7,8) und 26,4 mg Cystein.HCl während 2 min bei 2^{o} im Sorvall Omni-Mixer homogenisiert, dann zentrifugiert (15000 g, 15 min) und der Ueberstand für die Analysen im Eis aufbewahrt.

10. Enzymtests

10.1. Tyrosinase (EC 1.10.3.1)

Als Mass für die Aktivität der Tyrosinase diente die Bildung des Oxidationsproduktes GBQ aus dem Substrat GHB. Die Messungen erfolgten bei 490 nm und 25^{o} in Glasküvetten (d = 1 cm). Das Totalvolumen des Testansatzes betrug 2,5 ml.

Reaktionsansatz: Phosphatpuffer (0,05 m, pH 6,8), GHB: 2,1 μMol, Enzymlösung: 0,4 ml. Hemmung der Reaktion erfolgte durch Zugabe von KCN (2,5 μMol).

Die Substratkonzentration und den pH-Wert wählte man gleich wie für Ansätze mit Tyrosin beschrieben (vgl. Pomerantz und Peh-Chen Li, 1970).

10.2. Oxoprolinase

Der Nachweis von 5-Oxoprolinase erfolgte durch Messung der unter Ein-

wirkung des Enzyms auf L-Pyrrolidoncarbonsäure-U-^{14}C gebildeten ^{14}C-Glutaminsäure.

Reaktionsansatz: Tris/HCl-Puffer (0,05 m, pH 7,8), ATP: 5 μMol, Phosphoenolpyruvat: 5 μMol, KCl: 150 μMol, $MgCl_2$: 1 μMol, Dithiothreitol: 2 μMol, L-Methioninsulfoximin: 4 μMol, Pyruvatkinase: 10 U, L-Pyrrolidoncarbonsäure-U-^{14}C: 2 μMol (0,5 μCi), Enzymlösung: 0,4 ml. Das Totalvolumen betrug 1,0 ml.

Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 37^{o} stoppte man die Reaktion durch kurzes Erhitzen auf 100^{o} (2 min). Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (3000 g, 10 min) entfernt, ein Aliquot (0,5 ml) des Ueberstandes auf eine Säule mit 1,5 ml Kationenaustauscher (Dowex 50W-X8, H^+-Form) aufgetragen und nach Spülen mit 10 ml Wasser die Aminosäurefraktion mit 5 ml Ammoniak 3 n eluiert und die ^{14}C-Aktivität bestimmt (vgl. Van Der Werf et al., 1971).

10.3. γ-Glutamyltranspeptidase (EC 2.3.2.2)

Die Aktivitätsbestimmung von γ-Glutamyltranspeptidase beruht auf der Messung des aus dem Substrat γ-L-Glutamyl-p-nitroanilid enzymatisch freigesetzten p-Nitroanilins (Tate und Meister, 1974; Mooz und Wigglesworth, 1976).

Reaktionsansatz: Tris/HCl-Puffer (0,05 m, pH 8,0), $MgCl_2$: 10 μMol, Glycylglycin: 20 μMol, γ-L-Glutamyl-p-nitroanilid: 4 μMol, Enzymlösung: 0,02-0,05 ml. Das Totalvolumen betrug 1,0 ml.

Kontrollansätze wurden mit denaturiertem Enzym bzw. mit Puffer anstelle von Glycylglycin durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 37^{o} wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml Essigsäure 1,5 m abgestoppt und die Absorption der Lösung in Glasküvetten (d = 1 cm) bei 410 nm gemessen. Die Menge des gebildeten p-Nitroanilin wird aus einer Eichkurve ermittelt.

10.4. Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (EC 1.2.1.12)

Die Aktivitätsbestimmung von Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (Handelsprodukt der Firma Boeringer, Mannheim; isoliert aus Hefe) erfolgte spektrophotometrisch bei 25^{o} in Glasküvetten (d = 1 cm). Das Totalvolumen des Testansatzes betrug 3,0 ml.

Reaktionsansatz: Triaethanolamin-Puffer (0,1 m, pH 7,6), ATP: 3,3 μMol, Glycerinsäure-3-phosphat: 18,6 μMol, NADH: 0,6 μMol, EDTA: 2,7 μMol, $MgSO_4$: 6 μMol, 3-Phosphoglyceratkinase: 40 U, Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase: 1 μg.

Bei Präinkubation des Enzyms mit GBQ (0,013 mM) während 15 min bei 25^{o} erfolgte 90%ige Hemmung der Reaktion. Für die Herstellung von GBQ und die Berechnung seiner Konzentration s. II.7.2. bzw. Weaver et al. (1972).

11. Separation von Enzymen mittels Diskelektrophorese

Die Gele wurden mit dem Gelsystem Nr. 1 (pH 8,9; 7,5%) nach Maurer (1968) hergestellt. Die Polymerisation von Trenngel und Sammelgel erfolgte in Glasröhrchen von 0,5 cm Innendurchmesser. Die Rohexrakte wurden mit Saccharose (Endkonzentration 1 m) versetzt und auf die Sammelgele aufgetragen (0,1-0,2 ml). Die Trennung erfolgte an einem Diskelektrophoresegerät (Shandon Scientific) bei einer Stromstärke von 4 mA pro Gelröhrchen.

Nachweismethoden:

Tyrosinase: Die Gele inkubierte man in einer ges. Tyrosinlösung in Citratpuffer nach McIlvaine pH 5,75.

Peroxidase: Die Gele infiltrierte man zuerst 30 min mit Citratpuffer (pH 5,0; 30 mm Hg; 0^{o}) und inkubierte dann in einer Citratpufferlösung (pH 5,0) mit 0,5% Guajakol und 1% H_2O_2. Zur spezifischen Hemmung der Katalase wurden die Gele in 3-Amino-1,2,4-triazol (0,02 m) präinkubiert. Für die Bedingungen s. oben.

Allgemeiner Proteinnachweis: Inkubation in 0,05% Coomassie BB-Lösung während 30 min bei 60°.

12. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt von Enzymrohextrakten wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Die Messwerte sind auf kristallines Rinderserumalbumin bezogen.

13. Chromatographische Methoden

13.1. Dünnschichtchromatographie

Die Auftrennungen erfolgten, mit einer Ausnahme (Fliessmittel C: Cellulose F 254), auf Kieselgelplatten 60 F 254. Der Fluoreszenzindikator ermöglichte ein einfaches Auffinden praktisch aller analysierter Verbindungen im UV-Licht. Es wurden die folgenden Fliessmittel und Entwickler verwendet (Stahl, 1967):

γ-Glutamylphenole und andere Aminosäuren:

n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) (A)
Aethanol/Wasser (7:3) (B)
Phenol/Wasser (3:1) (C)
Sprühreagenzien: Ninhydrin (0,2% in Aethanol); $FeCl_3$ (2% in 0,5 n HCl); diazotiertes p-Nitroanilin.

Phenole und Phenolcarbonsäuren:

Chloroform/Toluol/Aceton (5:8:7) (D)
Chloroform/Eisessig (4:1) (E)
Sprühreagenzien: 3% $FeCl_3$ in Aethanol (vgl. Nicolaus et al., 1964); diazotiertes p-Nitroanilin; Silbernitrat-Ammoniak; diazotierte Sulfanilsäure.

Pyrrolsäuren: n-Butanol/Aethanol/NH_3 conc./Wasser (10:10:1:1) (nach Hackman und Goldberg, 1971).
Sprühreagens: diazotierte Sulfanilsäure/NaOH 1 n (nach Piattelli et al., 1963).

Radioaktivitätsmessungen (Scanning, vgl. II.14.2.) wurden vor dem Entwickeln der Chromatogramme vorgenommen.

13.2. Gaschromatographie

Die organischen Säuren wurden in Form der Methylester am Gaschromatographen aufgetrennt. Zu etwa 5 mg Probe wurde solange Diazomethan zugetropft, bis keine Stickstoffentwicklung mehr erkennbar war. Anschliessend entfernte man den Aether sowie überschüssiges Methylierungsagens im Rotationsverdampfer bei 20° im Vakuum und nahm die Methylester in 0,1 ml Methanol auf. Zur Analyse benützte man einen Varian Aerographen 1520-B mit FID. Stickstoff (40-50 ml/min) diente als Trägergas. Die Säule aus rostfreiem Stahl von 2,7 m Länge (Innendurchmesser 1/8 Zoll) war beschickt mit DEGS 15% auf Chromosorb WAW (60/80 mesh). Das Temperaturprogramm betrug 4°/min von 110-134° und 6°/min von 134-182°. Injektor und Detektor wiesen eine Temperatur von 200° auf.

14. Radioaktivitätsmessungen

14.1. Szintillationszählung

Wässerige Lösungen (0,1-1,0 ml) wurden mit 10 ml Zähllösung nach Bray (1960) intensiv gemischt und in einem Szintillationszähler (Nuclear Chicago Unilux II) auf Radioaktivität geprüft. Die Berechnung der Ausbeute erfolgte auf Grund des Kanalverhältnisses.

14.2. Scanning

Die Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung auf Dünnschichtplatten erfolgte mit einem Dünnschicht-Scanner II, Berthold (Proportionalzählrohr).

14.3. Radiogaschromatographie

Zur Analyse diente ein Gaschromatograph vom Typ Varian Aerograph 1200. Die Säule aus rostfreiem Stahl (5 Fuss x 1/4 Zoll) war gefüllt mit DEGS 15% auf Chromosorb WAW (60/80 mesh). Für das Temperaturprogramm zur Trennung der Methylester s. II.13.2. Der Trägergasstrom (50 ml Helium/min) wurde vor dem FID im Verhältnis 1:4 aufgeteilt und der grössere Anteil in einen Durchflussreaktor (RGC 170, Perkin-Elmer) geleitet. Hier erfolgte über Kupferoxid bei 700^{o} ein oxidativer Abbau der Methylester. Die Messung der Radioaktivität der so gebildeten Fragmente wurde mit einem 10 ml Proportionalzählrohr und dem Dual Ratemeter-Integrator LB 242 K (Berthold) ausgeführt. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im Methan-Heliumstrom (20:40 ml/min) bei einer Spannung von 2100 V.

15. Bestimmung des Markierungsmusters von ^{14}C-γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol (GHB)

Zur Ermittlung der Radioaktivitätsverteilung in biogenetischem ^{14}C-GHB wurde die mittels Dünnschichtscanning (vgl. II.13.1., Laufmittel C sowie II.14.2.) auf ihre Reinheit geprüfte Verbindung in azeotroper Salzsäure während 2 h am Rückfluss hydrolysiert. Nach Entfernen der Salzsäure im Vakuum-Rotationsverdampfer bei 35-40^{o} konnten die anfallenden Spaltprodukte p-Aminophenol und Glutaminsäure dünnschichtchromatographisch getrennt (vgl. II.13.1., Laufmittel A) und mit dem Dünnschicht-Scanner gemessen werden. Anschliessend wurden die entsprechenden Zonen herausgeschnitten und die Substanzen mit Wasser eluiert. Das Kieselgel wurde mit einer G4 Glasfritte abfiltriert und die Radioaktivität

im Filtrat gemessen. Mit dieser Methode konnte 90-95% der zur Hydrolyse eingesetzten Radioaktivitätsmenge in den Spaltprodukten wieder aufgefunden werden.

16. Trockengewichtsbestimmung

Das Pilzmaterial wurde in Wägegläschen bis zur Gewichtskonstanz (Dauer max. 24 h) bei 105^{o} getrocknet.

17. UV-Spektroskopie

Die UV-Spektren wurden in wässeriger Lösung in Quarzküvetten (d = 1 cm) bei Zimmertemperatur mit einem Beckman-Gerät (Typ DB-GT) aufgenommen.

18. IR-Spektroskopie

Alle IR-Spektren wurden mit KBr-Presslingen (0,33%) an einem Perkin-Elmer Spektrophotometer (Modell 157) aufgenommen.

III. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

1. Identität einiger γ-Glutamylderivate von A. bisporus

1.1. γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol (GHB)

Im Stiel- und Hutplectenchym von A. hortensis wurde GHB erstmals durch Biston et al. (1961) in der papierchromatographisch aufgetrennten Aminosäurefraktion quantitativ mittels einer densitometrischen Methode bestimmt. In einer vergleichenden Studie über die freien Aminosäuren in sechzehn Arten der Gattung Agaricus ermittelten Heinemann und Casimir (1961) in ganzen Fruchtkörpern semiquantitativ das Auftreten von GHB, und Weaver et al. (1971a) isolierten das Phenol ausschliesslich aus den Lamellen von A. bisporus.

Um aus dem Vorkommen von GHB in verschiedenen Wachstumsstadien des Kulturchampignons Rückschlüsse auf die potentielle Bedeutung dieser Substanz zu ziehen, war es notwendig, auch kleinste Mengen quantitativ zu erfassen. Als geeignet erwies sich ein auf Angaben von Weaver et al. (1971a) basierendes, jedoch bedeutend verbessertes Verfahren, bei dem Rohextrakte direkt an einer Sephadex G-25-Säule analysiert werden können. Durch Gelfiltration lassen sich bekanntlich Verbindungen auf Grund ihrer unterschiedlichen Molekülgrösse separieren; an eng vernetzten Dextrangelen, wie z.B. Sephadex G-25, manifestiert sich ein zusätzlicher Effekt: viele niedermolekulare Aromate werden am Gel adsorbiert und besitzen so grössere Elutionsvolumen als Nichtaromate mit vergleichbarem Molekulargewicht (Gelotte, 1960). Diese Retardation beruht vermutlich auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den phenolischen Hydroxylgruppen der Aromate und den Hydroxyaether-Vernetzungen der Dextranketten im Sephadex-Gel (Determann und Walter, 1968).

In Vorversuchen mit Testgemischen aus aromatischen und aliphatischen Aminosäuren liess sich GHB nur ungenügend von Tyrosin trennen, so dass die dem GHB-Peak (vgl. Abb. 1) entsprechenden Fraktionen bei

allen Versuchen dünnschichtchromatographisch und durch Aufnahme der UV-Spektren auf Reinheit geprüft werden mussten.

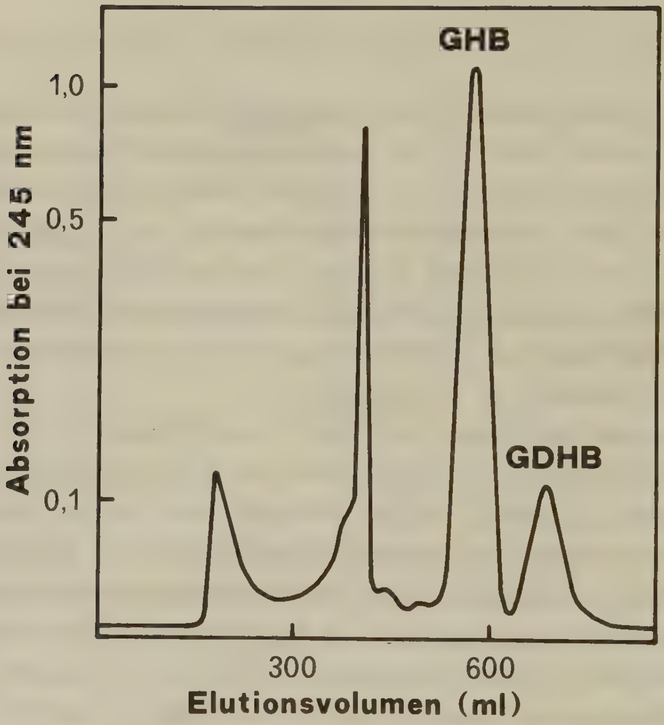


Abb. 1: Auftrennung eines Rohextraktes aus Lamellen von A. bisporus an Sephadex G-25 (fine). Extraktionsmittel 0,1 n HCl. GHB γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol, GDHB γ-L-Glutaminyl-3,4-dihydroxybenzol.

Bei einigen Analysen enthielten die ersten Fraktionen des GHB-Gipfels geringe Mengen Tyrosin. Dies erwies sich jedoch für die quantitativen Untersuchungen als irrelevant, da einerseits Tyrosin bei der für die Bestimmung von GHB benutzten Wellenlänge (245 nm) ein Absorptions-

minimum aufweist, andererseits Tyrosin nach Latché (1963) einen mengenmässig unbedeutenden Anteil der Aminosäurefraktion des Champignonfruchtkörpers repräsentiert. Tatsächlich enthalten Stiel und Hut lediglich Spuren und selbst Lamellen nur ca. 0,5 mg (TG-Basis) von Tyrosin.

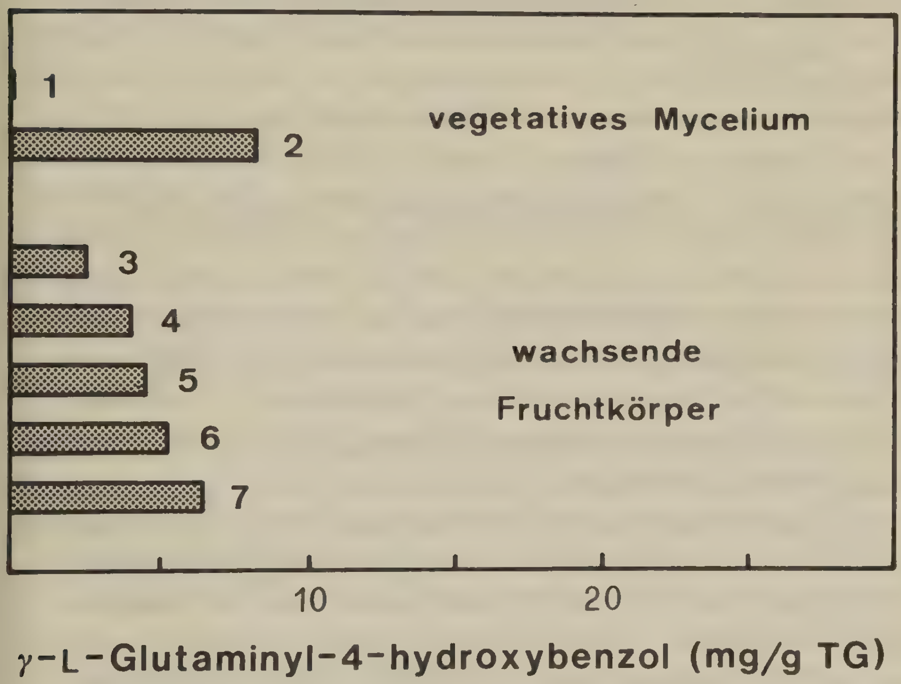


Abb. 2: Vorkommen von γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol in Mycelium und Fruchtkörpern von A. bisporus. 1 Mycelium, auf Vollmedium kultiviert; 2 Mycelium, auf kurzkompostiertem Pferdedung gezogen; 3 Pinheads (HutØ 3 mm); 4 junge Fruchtkörper (HutØ 20 mm); 5 junge Fruchtkörper (HutØ 35 mm); 6 Fruchtkörper vor dem Aufreissen des Velums (HutØ 50 mm); 7 sporulierender Fruchtkörper (HutØ 120 mm).

Wie Abb. 2 zeigt, wird das Phenol im vegetativen Mycelium in ganz unterschiedlichem Ausmass akkumuliert, was offensichtlich durch die unterschiedliche Zusammensetzung des Nährmediums bedingt ist. Beim Wachstum auf Vollmedium in Flüssigkulturen treten nur Spuren von GHB (ca. 0,04 mg/g TG) auf, bei der Kultivierung auf kurzkompostiertem Pferdedung - dem natürlichen Substrat - lässt sich vor der Fruktifikation die ca. 200-fache Konzentration des Phenols, also 21,3 mg/g TG nachweisen. Nach der Ernte der Fruchtkörper ist dieser Wert um 16% reduziert. Der hohe Gehalt an GHB während des Mycelwachstums liess an eine Bildung des Phenols im Kompost während des Abbaues des Substrates, d.h. vor allem Lignin oder Ligninabbauprodukte: vgl. Häsler-Küng (1974), denken. Ferner wurde ein Auftreten des GHB als Komponente des unbewachsenen Kompostes selbst in Betracht gezogen. Letztere Möglichkeit konnte jedoch durch die Analysen nicht untermauert werden. Bei Fruchtkörpern ist eine kontinuierliche Zunahme des GHB-Gehaltes während des Wachstums zu beobachten, vom kleinsten "Fruchtkörper" mit 2-3 mm Durchmesser, dem sog. Pinhead, bis zum sporulierenden, völlig geöffneten Sporokarpen.

Für die vorliegende Arbeit interessierte besonders das Vorkommen von GHB in morphologisch verschiedenen Teilen des sporulierenden Fruchtkörpers (vgl. Abb. 3). Während Hut und Stiel, im Vergleich zu ganzen Fruchtkörpern, "durchschnittliche" Mengen des Phenols aufweisen, ist der Unterschied zwischen Lamellen und Sporen eklatant: die Lamellen - Bildungsort der Sporen - enthalten von allen untersuchten Geweben weitaus am meisten GHB (21,3 mg/g TG); in Sporen fällt dieser Wert auf 0,24 mg/g TG. Lamellen akkumulieren also rund 100mal mehr GHB als Sporen; tatsächlich dürfte dieser Faktor - wegen bei der Extraktion auftretenden Verlusten - noch etwas grösser sein: man homogenisiert zwar mit HCl 0,1 n in der Kälte um eine enzymatische Oxidation des Phenols bei der Desintegration des Gewebes zu vermeiden, beim Herausschneiden der Lamellen aus dem Fruchtkörper ist jedoch die Entstehung von Oxidationsprodukten, und damit ein Verlust an GHB, nicht zu umgehen.

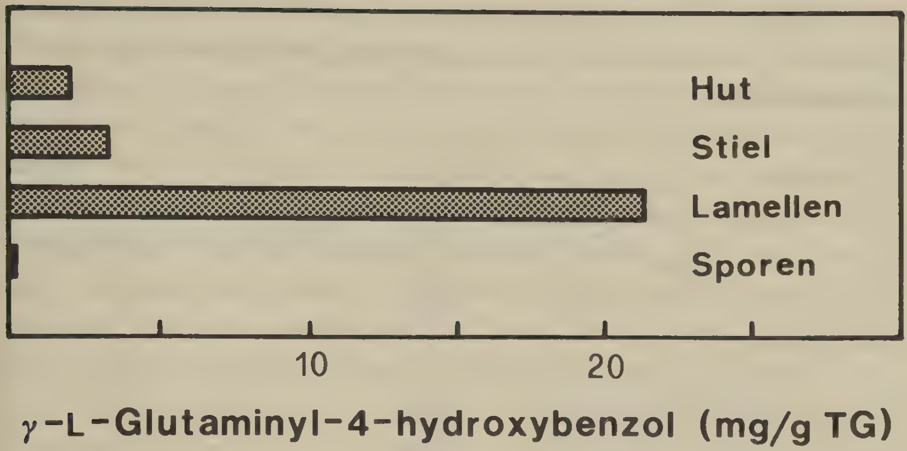


Abb. 3: Vorkommen von γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol in verschiedenen Teilen des sporulierenden Fruchtkörpers von A. bisporus.

Mit den spärlich vorliegenden Literaturangaben stimmen die obigen Resultate insofern überein, als GHB im Fruchtkörper bevorzugt im Hut (Biston et al., 1961), insbesondere aber in den Lamellen (Weaver et al., 1971a), akkumuliert wird.

1.2. γ-L-Glutaminyl-3,4-benzochinon

Die Homogenisierung von Fruchtkörpern mit Wasser liefert dunkelrote Extrakte, die sich allmählich über Braun nach Schwarz verfärben. Die so gebildeten Pigmente können an einer Sephadex G-25-Säule aufgetrennt werden (vgl. Abb. 4). Dabei erscheint zuerst, mit dem kleinsten Elutionsvolumen, eine Zone brauner Färbung (Absorptionsmaximum 360 nm), dann ein quantitativ unbedeutendes gelb-oranges Produkt und zuletzt, von den beiden ersten gut separiert, eine rote Verbindung (mit Absorptionsmaxima von 272 und 490 nm), die mit γ-L-Glutaminyl-3,4-benzochinon identisch ist. Das relative Verhältnis der einzelnen Farbstoffe ist in hohem Masse von der Dauer der Aufarbeitung abhängig: gelangt der Ex-

trakt nach etwa 15 min auf die Säule, so ist - neben dem orangefarbenen Pigment - vorwiegend GBQ feststellbar; nach 60 min überwiegt das braune Pigment.

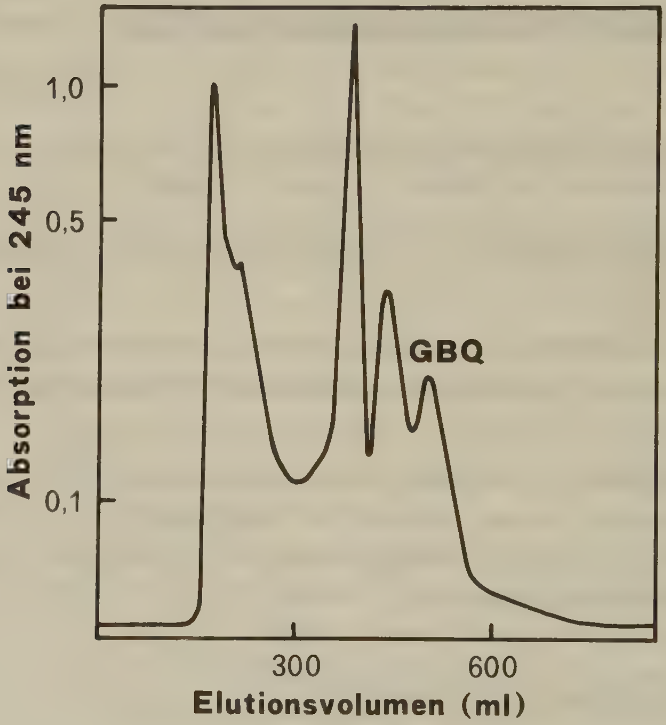


Abb. 4: Auftrennung eines wässerigen Rohextraktes aus Lamellen von A. bisporus an Sephadex G-25 (fine). GBQ γ-L-Glutaminyl-3,4-benzochinon.

Bei allen im folgenden beschriebenen Experimenten erfolgte die Identifikation des Benzochinons durch Vergleich der UV-Spektren der Analysensubstanz sowie der mit Natriumdithionit reduzierten Verbindung (Elimination des Maximums bei 490 nm) mit dem Spektrum von aus GHB durch Oxidation mit Tyrosinase synthetisch hergestelltem GBQ. Andere Nach-

weismethoden (z.B. Dünnschichtchromatographie) erwiesen sich für die unstabile Verbindung als ungeeignet.

Vergleicht man die in Abb. 1 und Abb. 4 gegebenen Elutionsprofile, so fällt auf, dass bei der Extraktion mit Wasser kein GHB auftritt, eine Beobachtung, die sich durch Ueberprüfen der Fraktionen von 540-620 ml Elutionsvolumen mittels Dünnschichtchromatographie verifizieren liess. Dieses Fehlen von GHB, die oben erwähnte Synthesemöglichkeit für GBQ durch enzymatische Oxidation von GHB sowie die hohe potentielle Tyrosinaseaktivität von Kulturchampignons (Häsler-Küng, 1974) - bekanntlich zur industriellen Gewinnung von Tyrosinase genutzt - lassen darauf schliessen, dass bei der Extraktion in Wasser wegen Zerstörung der Kompartimentierung zwischen Enzym und Substrat GHB vollständig zu farbigen Pigmenten, worunter GBQ, umgesetzt wird.

Da gewisse Autoren dem Benzochinon eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Keimruhe der Sporen von A. bisporus zuschreiben (vgl. Einleitung), die eigenen Resultate jedoch eher an einen Artefakt denken liessen, war es von besonderem Interesse, die in vivo Konzentration des Chinons zu ermitteln. Dazu musste die oxidative Bildung von GBQ aus GHB bei der Extraktion durch Denaturierung oder spezifische Inhibition der Phenoloxidasen vollständig blockiert werden. Durch Homogenisierung mit HCl 0,1 n, NaCN 0,01 m, NaN_3 0,1 m oder Natriumdiaethyldithiocarbaminat 0,0005 m konnte dies wohl erreicht werden, d.h. der Extrakt blieb farblos; Kontrollversuche zeigten aber, dass alle Inhibitoren auch das rote Benzochinon bis zu einem gewissen Grad entfärben (die Inkubation von GBQ mit den verschiedenen getesteten Agentien bewirkte nach 60 min eine Erniedrigung von E_{490} um 57% (NaN_3), 58% (NaCN), 62% (HCl) bzw. 80% (Natriumdiaethyldithiocarbaminat). Deshalb wurde Hemmung der Tyrosinase bereits im intakten Fruchtkörper anvisiert: Inkubation in einer Atmosphäre von 80% HCN erwies sich als eine hierzu bestens geeignete Methode. Die Auftrennung des leicht gelben Extraktes (E_{490} = 0,1) durch Gelchromatographie ergab ein der Abb. 4 sehr ähnliches Elutionsprofil, das durch das Fehlen von GHB und GDHB (s. unten) sowie durch einen Gipfel für GBQ gekennzeichnet ist, welch

letzterer jedoch auf der Anwesenheit eines gelben (und nicht roten) Pigmentes beruht. Champignonfruchtkörper enthalten also keine substantiellen Mengen von GBQ, und sein quantitativ bedeutendes Auftreten in Homogenaten von Sporokarpen stellt demnach einen Extraktionsartefakt dar. GBQ tritt wahrscheinlich nur als Intermediärprodukt auf (im Zeitpunkt der Melanisierung der Sporenwand: vgl. III. 3. und Diskussion). Bei Hemmung der Tyrosinase scheint GHB durch eine andere Phenoloxidase umgesetzt zu werden, und zwar zu einem gelben Produkt. Bei dieser könnte es sich um eine Peroxidase handeln, die durch HCN zwar auch, jedoch - im Unterschied zur Tyrosinase - in reversibler Weise, gehemmt wird (Saunders et al., 1964).

Tab. 1: Vorkommen von γ-L-Glutaminyl-3,4-benzochinon in wässerigen Extrakten aus Material von verschiedenen Teilen des sporulierenden Fruchtkörpers von A. bisporus. Für Details s. II. 5.

analysiertes Material	relativer Anteil an GBQ A_{490}
Hut	0,04
Stiel	0,10
Lamellen	1,52
Sporen	0,00

Wie aus Tab. 1 ersichtlich, ist der relative Gehalt an GBQ in den verschiedenen morphologischen Teilen eines sporulierenden Fruchtkörpers recht unterschiedlich. Beim Vergleich dieser Verteilung mit derjenigen von GHB in völlig geöffneten Fruchtkörpern (s. Abb. 3) lassen sich leicht gewisse Parallelen feststellen: das Vorkommen von GBQ scheint direkt von der jeweiligen GHB-Konzentration abhängig zu sein, ein wei-

teres Indiz dafür, dass es sich bei jenem Chinon um einen Extraktions- und Aufarbeitungsartefakt handelt.

1.3. γ-L-Glutaminyl-3,4-dihydroxybenzol (GDHB)

1.3.1. Identifizierung

Bei der Isolation von GHB aus Fruchtkörpern konnte bei der Gelchromatographie regelmässig das Auftreten einer Verbindung mit grösserem Elutionsvolumen (vgl. Abb. 1) aber im übrigen ähnlichen Eigenschaften wie GHB beobachtet werden: sie zeigte Autooxidation in wässeriger Lösung und liess sich mit Tyrosinase leicht zu farbigen Pigmenten oxidieren. Die Analysen der isolierten und gereinigten Verbindung ergaben folgende Resultate:

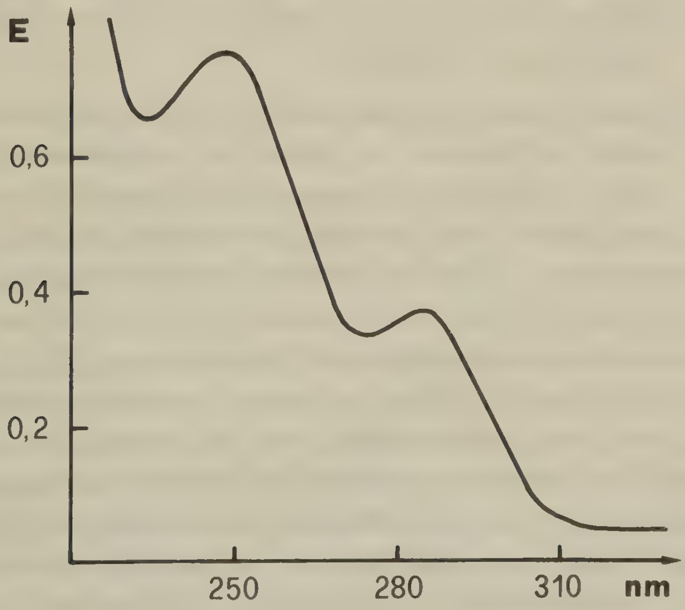


Abb. 5: UV-Spektrum von γ-L-Glutaminyl-3,4-dihydroxybenzol in Wasser.

Dünnschichtchromatographie: R_f = 0,24 in Fliessmittel (A); violett mit Ninhydrin, braun mit diazotiertem p-Nitroanilin, blau mit Eisenchlorid.

UV-Spektrum (vgl. Abb. 5): Absorptionsmaxima bei 248 und 285 nm. Verhältnis $A_{248} : A_{285}$ = 2,27. Eine bathochrome Verschiebung kann nicht beobachtet werden, da bei basischem pH-Wert eine Zersetzung erfolgt.

Schmelzpunkt: 208-210^{o} (unkorrigiert)

Hydrolyse: Nach der Hydrolyse in HCl (für die Bedingungen s. II.14.) konnte dünnschichtchromatographisch mit den drei Laufmittelsystemen (A), (B) und (C) Glutaminsäure nachgewiesen werden. Weitere, im UV sichtbare Spaltprodukte liessen sich nicht identifizieren.

Oxidation mit Tyrosinase: Die enzymatische Oxidation (gleiche Versuchsbedingungen wie in II.7.2.) ergab u.a. ein rotes, eindeutig mit GBQ identisches Pigment.

Diese Resultate liessen vermuten, dass es sich bei dem unbekannten Phenol um das von Weaver et al. (1971b) als Zwischenprodukt der Oxidation von GHB zu GBQ vorgeschlagene γ-L-Glutaminyl-3,4-dihydroxybenzol handeln könnte, eine Annahme, die durch das Ergebnis eines weiteren Experimentes (s. Abb. 6) unterstützt wurde. Bekanntlich tritt bei der enzymatischen Oxidation von Tyrosin über Dopachinon und Dopachrom zu Melanin eine kurze lag-Phase auf (Horowitz et al., 1970). Durch Addition einer Spur von DOPA, dem ersten Intermediärprodukt der Oxidation, kann diese "Induktionsphase" eliminiert werden. Wie aus Abb. 6 ersichtlich ist, tritt bei der Oxidation von GHB mit Tyrosinase ebenfalls eine lag-Phase auf; auch hier lässt sich dieser Effekt durch Zugabe katalytischer Mengen von GDHB aufheben. Die endgültige Bestätigung der Identität der interessierenden Substanz mit γ-L-Glutaminyl-3,4-dihydroxybenzol durch NMR-Spektroskopie erfolgte im Organisch-chemischen Institut der Universität durch Prof. W. v. Philipsborn.

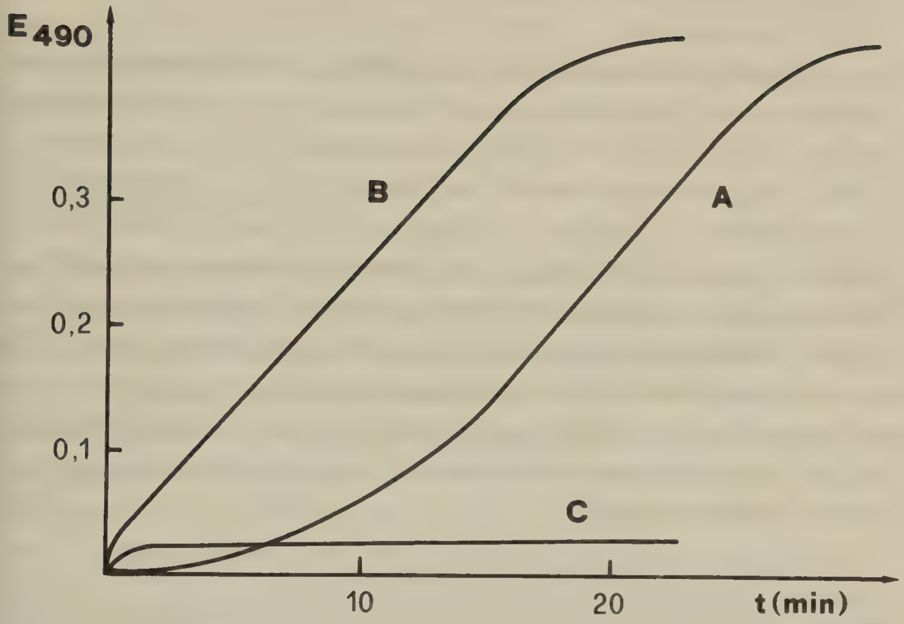


Abb. 6: Oxidation von γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol (GHB) mit Tyrosinase.
A GHB + Tyrosinase
B GHB + Tyrosinase + 0,2% GDHB
C Kontrolle: wie B, jedoch ohne GHB

Praktisch gleichzeitig mit diesen Untersuchungen erschien von Szent-Gyorgyi et al. (1976) eine Publikation unter dem Titel: "Agaridoxin, a mushroom metabolite. Isolation, structure, and synthesis". Der Trivialname Agaridoxin steht für γ-L-Glutaminyl-3,4-dihydroxybenzol; es wurde aus methanolischen Fruchtkörperextrakten von A. campestris durch Fällung mit Bleiacetat gewonnen. Die publizierten analytischen Daten für Agaridoxin stimmen mit den eigenen Werten für GDHB aus A. bisporus völlig überein.

1.3.2. Vorkommen

Bei der quantitativen Bestimmung von GDHB in verschiedenen Entwicklungsstadien des Champignons musste wiederum eine oxidative Entstehung aus GHB während des Extraktionsvorganges in Betracht gezogen werden. Man verzichtete deshalb auf die Analyse von morphologisch unterschiedlichem Plectenchym und untersuchte ausschliesslich frisch gepflückte, intakte Fruchtkörper und verwendete flüssigen Stickstoff und Salzsäure als Extraktionsmittel. Die angewendete Methode erlaubte, im gleichen Extrakt sowohl GDHB als auch seine unmittelbare Vorstufe GHB zu bestimmen. Dies war von besonderem Interesse, konnten doch aus der Kenntnis des Verhältnisses Monophenol/Diphenol wertvolle Hinweise über die Bedeutung dieser Substanzen im Sekundärstoffwechsel des Champignons erwartet werden.

Tab. 2: Vorkommen von γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol und γ-L-Glutaminyl-3,4-dihydroxybenzol in verschiedenen Entwicklungsstadien von A. bisporus.

analysiertes Material	GHB μMol/g TG	GDHB μMol/g TG	Anteil GDHB bezogen auf GHB (in %)
Kompostmycel	34,5	0,0	0
Fruchtkörper (Ø = 20 mm)	18,5	0,8	4
Fruchtkörper (Ø = 50 mm)	22,3	2,4	11
Fruchtkörper (Ø = 100 mm)	28,1	4,7	17

Wie Tab. 2. zeigt, enthält auf natürlichem Substrat kultiviertes Mycelium noch kein GDHB; erst nach der Fruktifikation wird das Diphenol

gebildet und mit zunehmendem Alter in den Sporokarpen angehäuft. Bezogen auf GHB, nimmt der Gehalt an GDHB von 4% in kleinen Fruchtkörpern bis zu 17% in sporulierenden Fruchtkörpern zu (vgl. hierzu Diskussion).

1.4. Pyrrolidoncarbonsäure

Die Pyrrolidoncarbonsäure (Pyroglutaminsäure, 5-Oxoprolin) entsteht durch intramolekulare Säureamidbildung zwischen der Aminogruppe und der γ-Carboxylgruppe der Glutaminsäure und kann demnach im weiteren Sinn als γ-Glutamylderivat angesprochen werden. Die Verbindung, erstmals von Le Roux (1962) papierchromatographisch in Fruchtkörpern von A. bisporus nachgewiesen, tritt auch im Mycelium (Piquemal et al., 1970) und in den Sporen des Champignons auf (Rast und Stäuble, 1970). Das Lactam verhält sich chemisch wie eine organische Säure und wird deshalb bei der Separierung von Pilzextrakten an Ionenaustauscherharzen zusammen mit der Fraktion der organischen Säuren vom Anionenaustauscher eluiert.

Um ein genaueres Bild über den relativen Anteil der Pyrrolidoncarbonsäure in verschiedenen Entwicklungsstadien des Champignons zu erhalten, wurden die Säurefraktionen aus Sporen, Mycelium und Fruchtkörpern in Form ihrer Methylester am Gaschromatographen analysiert (vgl. Abb. 7). Das Erscheinen der Pyrrolidoncarbonsäure in Form von zwei Gipfeln beruht auf der Bildung von zwei verschiedenen Derivaten bei der Veresterung mit Diazomethan: neben der Carboxylgruppe wird vermutlich auch die sekundäre Aminogruppe des heterozyklischen Ringes methyliert (vgl. Rast et al., 1976a). Der Anteil an Pyrrolidoncarbonsäure, bezogen auf die Hauptkomponenten Aepfelsäure und Bernsteinsäure, ist im Fruchtkörper bedeutend geringer als in Sporen; in diesen wird Pyrrolidoncarboxylat zudem während der Lagerung abgebaut (Zobrist, 1975).

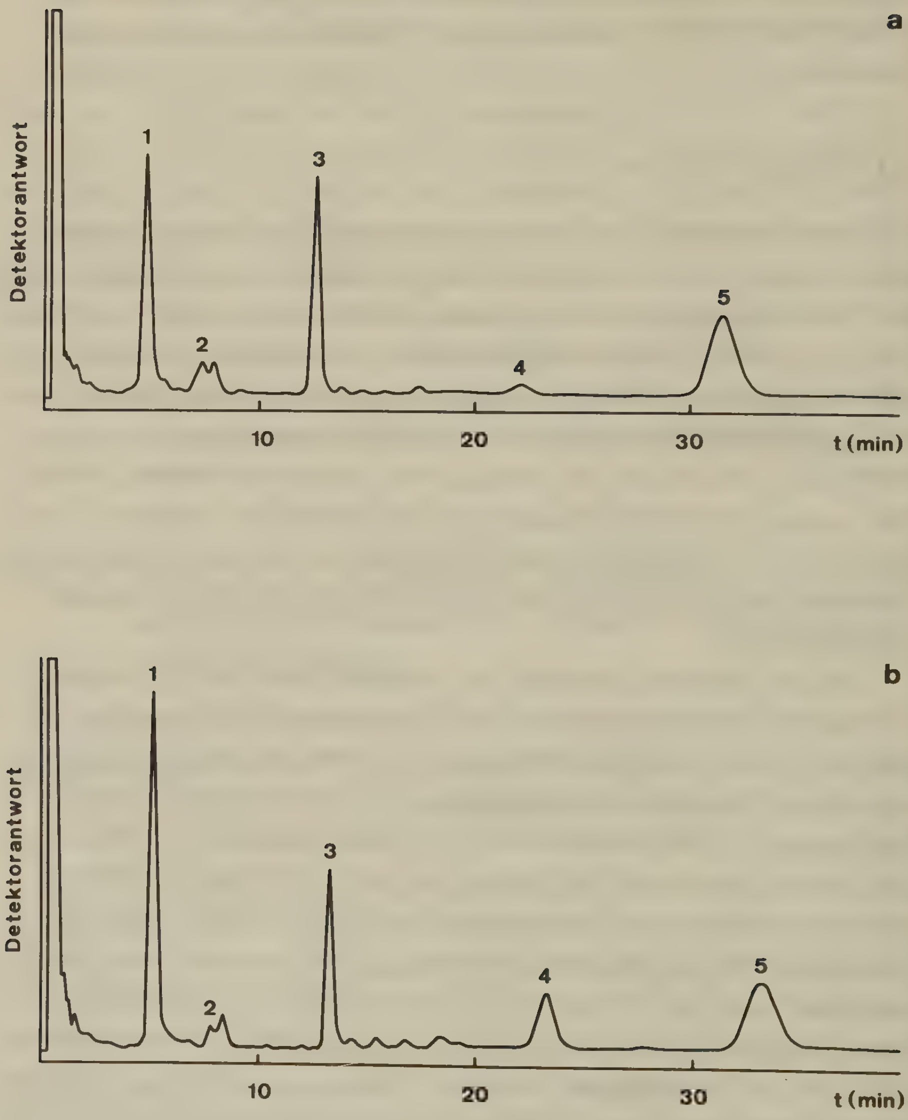

a
Detektorantwort
1
2
3
4
5
10
20
30
t (min)
b
Detektorantwort
1
2
3
4
5
10
20
30
t (min)

Abb. 7 (a) und (b)

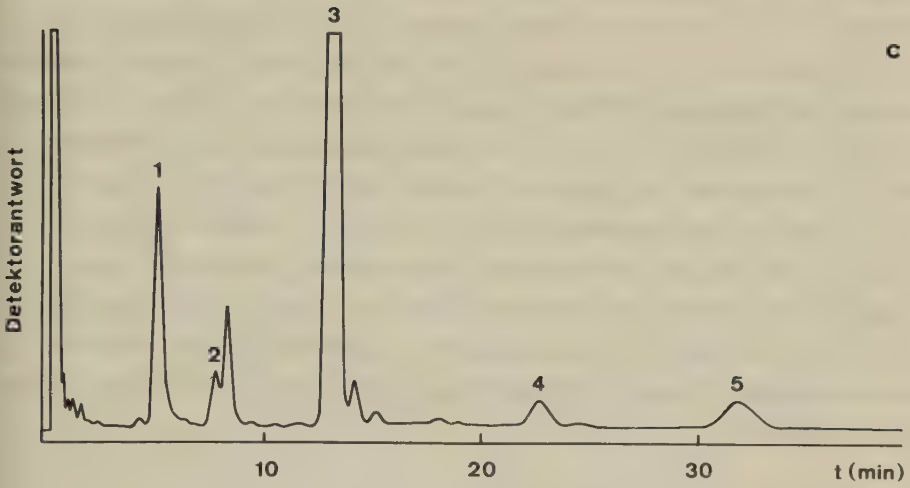


Abb. 7 (a-c): Gaschromatographische Analyse der nichtflüchtigen organischen Säuren von A. bisporus.

a) Sporen

b) Mycelium

c) Fruchtkörper

Die Gipfel entsprechen den Methylestern von:

1 Bernsteinsäure, 2 und 5 Pyrrolidoncarbonsäure,

3 Aepfelsäure, 4 Citronensäure.

Nach Zobrist (1975) tritt Phthalsäure in grossen Mengen in sämtlichen Entwicklungsstadien von A. bisporus auf, eine Angabe, die sich im Verlauf der vorliegenden Untersuchungen über die Zusammensetzung der Säurefraktion nicht verifizieren liess, da diese Verbindung stets nur in Spuren vorkam. Um einen methodischen Fehler auszuschliessen, erfolgte deshalb eine minuziöse Ueberprüfung der Extraktions- und Aufarbeitungsverfahren. Dabei wurde u.a. dem Pilzmaterial vor der Extraktion eine bestimmte Menge Phthal- sowie Pimelinsäure (als interner Standard) zugegeben: das quantitative Wiederauffinden dieser Säuren bestätigte die

Effektivität der angewendeten Methode. Aus diesem Grunde sowie auch deshalb, weil verschiedene Phthalsäureester, wie Dibutyl-phthalat, Dioctyl-phthalat und Di(2-aethylhexyl)-phthalat, in grossen Mengen in Kunststoffen als Weichmacher Verwendung finden (Albro und Moore, 1974) und diese im Laboratorium u.a. in verschiedenen organischen Lösungsmitteln und in Filterpapier (Asakawa und Genjida, 1970; Berry und Gramshaw, 1974) sowie in deionisiertem Wasser (Tahara und Mizutani, 1974) nachweisbar sind, ist ein nichtbiogener Ursprung der Phthalsäure in A. bisporus als gegeben zu betrachten, dies um so mehr, als eigene Arbeiten zeigten, dass die zur Elution der organischen Säuren vom Anionenaustauscher benutzte Ameisensäure (vgl. II.6.1.) Spuren von Phthalsäure enthielt.

2. Der Stoffwechsel von γ-Glutamylderivaten in A. bisporus

2.1. Biogenese von γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol

Da zur Biosynthese von GHB keine Literaturangaben vorlagen, mussten potentielle Präkursoren durch Bausteinanalyse ermittelt werden. Die Struktur des Moleküls lässt an die Beteiligung von zwei grundsätzlich verschiedenen Stoffwechselwegen denken: während die Seitenkette (der γ-Glutamylrest) aus dem Aminosäurestoffwechsel anfallen dürfte, ist für den Benzolring einer der beiden bekannten Hauptwege zur Biogenese von Phenolen, der Acetat/Malonat- oder der Shikimisäureweg, in Betracht zu ziehen. Der naheliegende Versuch, für die Tracerexperimente in Flüssigkulturen gezogenes Mycelium zu verwenden, erwies sich aufgrund der äusserst geringen Konzentration von GHB in diesem Material als undurchführbar (vgl. III.1.1.). Es wurden deshalb intakte Fruchtkörper verwendet, denn Untersuchungen von Rast (1966) mit ^{14}C-Mannit hatten gezeigt, dass der Tracer aus wässeriger Lösung über den Stiel bis in die Lamellen - das Gewebe mit der höchsten GHB-Konzentration - transloziert wird. Die Fütterung diverser ^{14}C-markierter Präkursoren - wegen einer möglichen Enzyminduktion mit unveränderter, d.h. mit der von der Herstellerfirma gelieferten spezifischen Aktivität (und somit in

Tab. 3: Effektivität ^{14}C-markierter Substanzen als Präkursoren von γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol im Fruchtkörper von A. bisporus.

Präkursor	gefütterte Menge μMol	spez. Akt. des Präkursors μCi/μMol	spez. Akt. des isolierten GHB μCi/μMol x 10^{-3}	Verdünnungsfaktor (nicht korrigiert)
$NaH^{14}CO_3$	5,00	60	5,84	10345
Essigsäure-U-^{14}C	1,72	58	116,29	499
L-Glutamin-U-^{14}C	1,16	43	110,89	388
L-Glutaminsäure-U-^{14}C	1,32	38	101,80	373
L-Pyrrolidoncarbonsäure-U-^{14}C	1,25	40	106,56	375
Glucose-U-^{14}C	0,31	327	133,17	2455
Phenol-U-^{14}C	0,52	58	4,33	13395
Benzoesäure-(Ring)-U-^{14}C	0,28	108	48,95	2206
Shikimisäure-U-^{14}C	0,48	21	627,45	33

geringster Konzentration) eingesetzt - ergab die in Tab. 3 dargestellten Resultate. Danach erfolgte bei allen geprüften Vorstufen ein Einbau in das Zielmolekül; die niedrigsten Inkorporationsraten ergaben sich mit Natriumbicarbonat und Phenol, welch letzteres sich jedoch aus methodischen Gründen als problematischer Präkursor erwies, da es beim Einstellen des Fruchtkörpers in die Tracerlösung sofort oxidiert wurde (vermutlich durch an der Schnittstelle freigesetzte Phenoloxidasen). Der Einbau von Shikimisäure war weitaus am effektivsten, derjenige der miteinander strukturell eng verwandten Verbindungen Glutaminsäure, Glutamin und Pyrrolidoncarbonsäure wesentlich geringer und erfolgte für alle drei Präkursoren praktisch im gleichen Ausmass (vgl. Tab. 3).

Tab. 4: Bestimmung des Markierungsmusters von γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol nach Applikation verschiedener Präkursoren.

Präkursor	^{14}C-Verteilung (in %)	
	Glutaminsäure	p-Aminophenol
$NaH^{14}CO_3$	99	1
Phenol-U-^{14}C	99	1
L-Glutamin-U-^{14}C	98	2
L-Glutaminsäure-U-^{14}C	98	2
L-Pyrrolidoncarbonsäure-U-^{14}C	98	2
Essigsäure-U-^{14}C	95	5
Benzoesäure-(Ring)-U-^{14}C	94	6
Glucose-U-^{14}C	31	69
Shikimisäure-U-^{14}C	1	99

Genauere Informationen und damit die Möglichkeit für Rückschlüsse auf die Herkunft von Ring und Seitenkette liefert die Bestimmung der ^{14}C-Verteilung innerhalb des GHB-Moleküls nach Fütterung der verschiedenen Präkursoren. Wie aus Tab. 4 ersichtlich, erfolgt bei der Mehrzahl der geprüften Tracer der Einbau von Radioaktivität bevorzugt in die Seitenkette mit prozentualen Anteilen zwischen 99% (für Natriumbicarbonat) und 94% (für Benzoesäure). Bei Applikation von Glucose dagegen ist der Ring bereits doppelt so stark markiert wie die Seitenkette, und der Präkursor Shikimisäure wird ausschliesslich in den Ring von GHB inkorporiert.

Ein interessantes Resultat, das jedoch für die vorliegende Arbeit ausserhalb der anvisierten Thematik liegt, ergab das Experiment mit radioaktiver Benzoesäure. Diese wird durch den Champignon metabolisiert und offensichtlich sehr schnell in den Aminosäurestoffwechsel eingeschleust, eine Beobachtung, die im Zusammenhang mit dem wenig erforschten Wachstum von A. bisporus auf Holz bzw. mit der damit verbundenen Lignindegradation (vgl. Häsler-Küng und Rast, 1974) besonders bemerkenswert erscheint.

2.2. Biogenese von Pyrrolidoncarbonsäure

Pyrrolidoncarbonsäure kann als Aufarbeitungsartefakt durch Erhitzen in wässeriger Lösung, Autoklavieren (Meister, 1965; Johnston und Hamill, 1968) oder an sauren Ionenaustauscherharzen (Wilkinson et al., 1966) aus Glutaminsäure bzw. Glutamin entstehen. Das Auftreten dieses Lactams als normaler Metabolit von A. bisporus kann jedoch durch die Resultate entsprechender Untersuchungen von Stäuble (1972) und Piquemal et al. (1972) als gesichert gelten.

Um einen Einblick in den Stoffwechsel von Pyrrolidoncarbonsäure zu erhalten, wurden Mycelkulturen mit 2-^{14}C-Acetat inkubiert und anschliessend die Verteilung der Radioaktivität in der Fraktion der nichtflüchtigen organischen Säuren durch Radiogaschromatographie bestimmt.

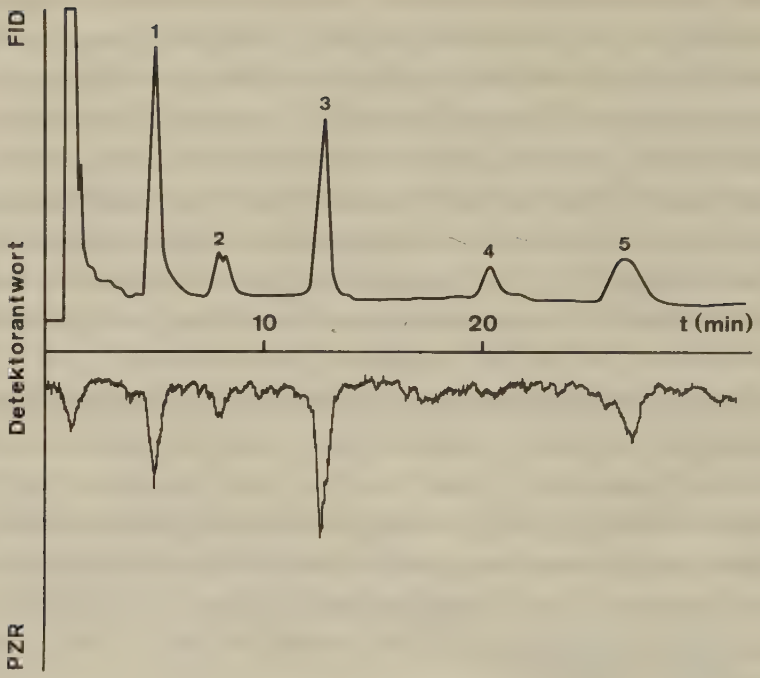


Abb. 8: Gaschromatographische Auftrennung der organischen Säuren aus Mycelium von A. bisporus nach Fütterung von ^{14}C-Acetat unter simultaner Aufzeichnung der Radioaktivität (gemessen im Proportionalzählrohr).

Die Gipfel entsprechen den Methylestern von:

1 Bernsteinsäure, 2 und 5 Pyrrolidoncarbonsäure, 3 Aepfelsäure, 4 Citronensäure.

Aus Abb. 8 ist ersichtlich, dass neben den Hauptkomponenten Aepfelsäure und Bernsteinsäure auch Pyrrolidoncarbonsäure markiert ist. Entsprechend der bekannten Metabolisierung von Essigsäure via Citronensäurezyklus ist die Bildung des Lactams aus α-Ketoglutarat über das Intermediärprodukt Glutaminsäure als gegeben zu betrachten.

2.3. Enzyme des γ-Glutamylzyklus

In diesem Stoffwechselweg, von dem angenommen wird, dass er den Transport von Aminosäuren durch Membranen bewerkstelligt (vgl. Einleitung), treten als Intermediärprodukte γ-Glutamylderivate, 5-Oxoprolin (Pyrrolidoncarbonsäure) und Glutaminsäure auf, Metaboliten also, wie sie auch in Sporen, Mycelium und Fruchtkörpern des Champignons zu finden sind. Als Schlüsselenzyme des γ-Glutamylzyklus kann man die γ-Glutamyltranspeptidase und die 5-Oxoprolinase bezeichnen. Die γ-Glutamyltranspeptidase überträgt den Glutamylrest von γ-Glutamylderivaten auf die zu transportierenden Aminosäuren (Akzeptoren); die 5-Oxoprolinase katalysiert die ATP abhängige Hydrolyse von 5-Oxoprolin zu Glutaminsäure. Um die Möglichkeit einer Funktion dieses Zyklus in A. bisporus zu prüfen, versuchte man, die beiden Enzyme in Rohextrakten aus Fruchtkörpern nachzuweisen.

Tab. 5: Spezifische Aktivität zweier Enzyme des γ-Glutamylzyklus in Rohextrakten aus Fruchtkörpern von A. bisporus.

Enzym	spez. katalytische Aktivität nkat . mg^{-1}
5-Oxoprolinase	0,014
γ-Glutamyltranspeptidase	1,167

Der Nachweis der 5-Oxoprolinase erfolgte unter Verwendung von 5-Oxoprolin-U-^{14}C als Substrat. Bei diesem radiologischen Verfahren (vgl. II.10.2.) lässt sich die Aktivität des betreffenden Enzyms - nach Entfernen nicht umgesetzten Substrates am Kationenaustauscher - anhand der ^{14}C-Aktivität in Glutaminsäure feststellen (bei Verwendung gereinigter Enzymextrakte). Die geringe so festgestellte Aktivität des Enzyms

(vgl. Tab. 5) verlangte jedoch zusätzlich nach einer Ueberprüfung der Identität der Reaktionsprodukte. Nach der Isolation der im Reaktionsgemisch enthaltenen Aminosäuren und deren dünnschichtchromatographischen Auftrennung (Laufmittel C) zeigte sich beim Scanning, dass die Radioaktivität der Fraktion bei Ansätzen mit Methioninsulfoximin, einem irreversiblen Inhibitor der Glutaminsynthetase (Van Der Werf et al., 1971), praktisch zu 100% der Glutaminsäure zugeordnet ist. Bei Reaktionen ohne Inhibitor liess sich neben ^{14}C-Glutaminsäure auch ca. 20% ^{14}C-Glutamin, offensichtlich durch Glutaminsynthetaseaktivität im Rohextrakt gebildet, nachweisen. Auf Grund dieser Resultate und von Kontrollversuchen mit denaturiertem Enzym kann das Vorliegen von 5-Oxoprolinase in Fruchtkörpern von A. bisporus als gesichert gelten.

Das Verfahren zum Nachweis von γ-Glutamyltranspeptidase beruht auf der Freisetzung von p-Nitroanilin aus dem Substrat γ-Glutamyl-p-nitroanilid in Gegenwart eines geeigneten Glutaminsäureakzeptors. Die Konzentration des gelben p-Nitroanilins lässt sich anhand einer Eichkurve bei 410 nm ermitteln. Der in Tab. 5 gezeigte Substratumsatz wurde mit Glycylglycin als Akzeptor bestimmt; bei Ansätzen ohne exogenen Akzeptor ergab sich eine spez. Aktivität von 0,602 nkat . mg^{-1}. Dass lediglich eine Verminderung des Substratumsatzes um 50% auftrat, dürfte u.a. auf die Anwesenheit von Aminosäuren im Rohextrakt zurückzuführen sein. Zudem ist von pflanzlichen γ-Glutamyltransferasen bekannt, dass sie Hydrolaseaktivität zeigen, d.h. Wasser kann als Akzeptor für den γ-Glutamylrest fungieren (Thompson et al., 1964).

3. Vorkommen und Biogenese von Melanin in A. bisporus

Die Melanine, hochpolymere Moleküle von weitgehend unbekannter Struktur, sind bei Tieren, höheren Pflanzen und Pilzen allgemein verbreitet. Die meist braunen oder schwarzen Pigmente entstehen durch enzymatische Oxidation von Phenolen und deren nachfolgender Polymerisation. Tyrosin, Tyramin, DOPA, Dopamin, Brenzcatechin und 1,8-Dihydroxynaphtalin (Piattelli et al., 1965; Andrews und Pridham, 1967; Wheeler

et al., 1978) sind die bisher am besten untersuchten Melaninpräkursoren. Charakteristisch für die so gebildeten Makromoleküle ist die Unlöslichkeit in Säuren und organischen Lösungsmitteln (nur in Basen, z.B. in verdünnter KOH, sind einzelne dieser Pigmente löslich) sowie die ausgeprägte Thermostabilität, sind doch Melanine bekannt, die sich erst bei Temperaturen über 600^{o} zersetzen. Auf Grund dieser Eigenschaften gestalten sich die Isolation und besonders die Strukturabklärung schwierig; moderne physikalisch-chemische Methoden wie NMR- und Massenspektroskopie liefern wenig Informationen, so dass immer noch traditionelle chemische Abbaumethoden, wie Elementaranalyse, Alkalischmelze und Oxidation mit $KMnO_4$, zur Anwendung gelangen (vgl. Nicolaus, 1968).

3.1. Melanin: eine Sporenwandkomponente

Wie frühere elektronenmikroskopische und chemische Untersuchungen zur Architektur der Sporenwand von A. bisporus zeigten (Hollenstein 1975; Rast und Hollenstein, 1977), ist Melanin ein charakteristischer Bestandteil der äusseren, granulär-amorphen Wandschicht. Diese ist chemisch sehr resistent; durch Phosphorolyse (H_3PO_4 85%, 55^{o}, 14 d) lässt sich das Pigment in Lösung bringen (Rast und Hollenstein, 1977). Nachdem die eigenen Analysen gezeigt hatten, dass γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol - ein Phenol und damit ein potentieller Melaninpräkursor - in den Lamellen akkumuliert, in den Sporen jedoch kaum mehr nachweisbar ist (vgl. III.1.1.), war es naheliegend, im Melanin der Sporenwand ein Polymerisationsprodukt des Monomeren GHB zu vermuten.

Zur Isolation des Champignonmelanins wurde ein von Piattelli et al. (1965) für die Sporen von Ustilago maydis beschriebenes Verfahren angewendet, bei dem durch intensive Extraktion mit heissen organischen Lösungsmitteln und mit Salzsäure am Rückfluss alle löslichen Zellbestandteile entfernt werden. Dabei konnten aus 5 g Sporen 180 mg eines braunen, amorphen Produktes gewonnen werden; dies entspricht 4% des Trockengewichtes oder ca. 10 - 12% des Sporenwandtrockengewichtes. Sehr ähnliche Ausbeuten ergaben Untersuchungen an Hyphenwandmelanin

von Rhizoctonia solani und Cladosporium sp.: hier betrug der Melaninanteil 8,5 - 12,8% des Wandgewichtes (Potgieter und Alexander, 1966).

Das aus A. bisporus isolierte Melanin ist in verdünnter KOH löslich, und das Absorptionsspektrum der braunen Lösung zeigt keine Banden im 300 - 700 nm Bereich. Das Pigment ist unlöslich in Wasser, Methanol, Aethanol, Butanol, Aceton, Dimethylformamid, Dioxan, Tetrahydrofuran, Chloroform, Petrolaether, Salzsäure und Schwefelsäure. Aus dem IR-Spektrum ergeben sich, wie allgemein für Melanine typisch, nur wenige Hinweise über die Struktur; eindeutige Banden erscheinen bei 3300, 1600 und 1100 cm^{-1}. Die Elementaranalyse zeigt einen bemerkenswert hohen Stickstoffgehalt auf (die Resultate sind korrigiert für 9,6% Rückstand): C 57,0; H 3,8; N 8,8; S 3,1.

Versuche, das Pigment durch Alkalischmelze bei 200^{o}, wie für U. maydis beschrieben (Piattelli et al., 1965), zu degradieren, schlugen fehl; erst bei Erhöhung der Temperatur auf 320^{o} (vgl. Nicolaus et al., 1964) traten Abbauprodukte auf. Bei der Separierung dieser Substanzen mittels Dünnschichtchromatographie liessen sich wohl ein "neutrales" Phenol und mindestens vier Phenolcarbonsäuren nachweisen; eine Identifizierung gelang jedoch nicht. Aus Co-Chromatogrammen und spezifischen Farbreaktionen kann geschlossen werden, dass es sich bei den jeweils in äusserst geringen Konzentrationen anfallenden Degradationsprodukten weder um Catechol, Protokatechusäure und Salicylsäure - die Abbauprodukte des Melanins von U. maydis (Piattelli et al., 1965) -, noch um p-Hydroxybenzoesäure - das Phenol des Melanins von Alternaria sp. (Pridham und Woodhead, 1977) - oder um p-Aminobenzoesäure handelt. Ebenso scheinen keine der aus Sepiamelanin bekannten Indolderivate (Piattelli et al., 1963) gebildet zu werden.

Das Pigment liess sich nicht mit $KMnO_4$ oxidieren: nach DC des Reaktionsgemisches treten keine im UV sichtbaren Abbauprodukte, insbesondere auch nicht die für diese Oxidation typischen Pyrrolsäuren (Nicolaus et al., 1964) auf. Ebensolche Stabilität gegenüber Oxidationsmitteln ist vom aus Alternaria sp. isolierten Melanin bekannt (Pridham und Woodhead, 1977).

3.2. Die Phenoloxidasen der Sporen

An der Biogenese der Melanine sind Phenoloxidasen, insbesondere Tyrosinase (Nicolaus, 1968), beteiligt. Der Fruchtkörper von A. bisporus ist für seine ausgeprägte Tyrosinaseaktivität bekannt (vgl. Häsler-Küng und Rast, 1974), und die für die Synthese von GBQ aus GHB (vgl. III. 1.2.) bzw. GDHB (vgl. III.1.3.1.) verwendete Tyrosinase ist ein aus dem Champignon gewonnenes Handelsprodukt ("mushroom tyrosinase").

Im Zusammenhang mit der oben erwähnten Möglichkeit einer Biogenese von Melanin mit GHB als Monomer war es deshalb von besonderem Interesse zu prüfen, ob in den Sporen von A. bisporus auch Tyrosinase und evtl. andere Phenoloxidasen vorliegen.

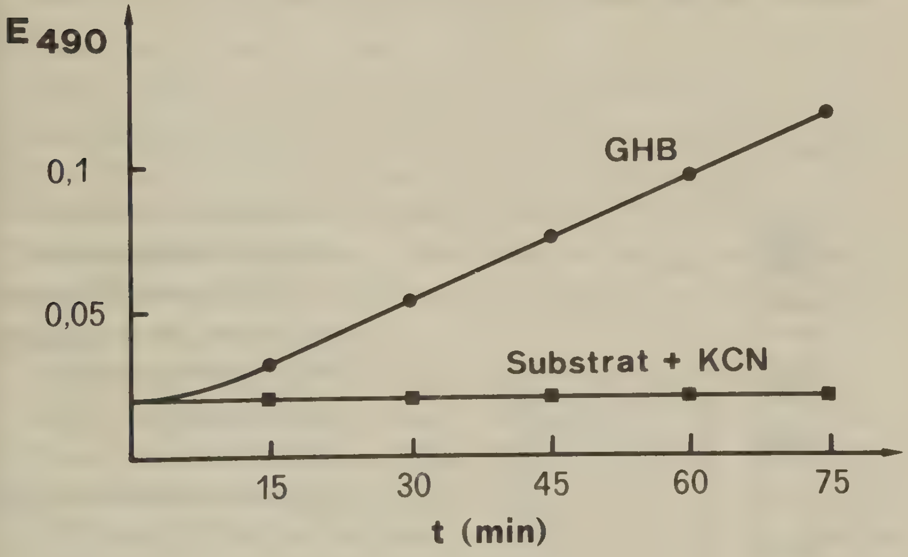


Abb. 9: Oxidation von γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol (GHB) durch partiell gereinigte Tyrosinase aus Sporen von A. bisporus und Hemmung der Reaktion durch KCN.

Zur Bestimmung der Aktivität von Tyrosinase dienen üblicherweise Substrate wie Tyrosin, DOPA, p-Kresol oder Brenzcatechin. Für die folgenden Experimente wurde jedoch das "natürliche" Substrat GHB (vgl. III.1.1.) verwendet. Die Erfassung des Reaktionsproduktes GBQ erfolgte spektrophotometrisch (s. II.10.1.). Wie aus Abb. 9 ersichtlich ist, zeigen die Sporen nur schwache Tyrosinaseaktivität. Dass die Extinktionszunahme enzymatisch bedingt ist, konnte jedoch durch Kontrollversuche mit denaturiertem Enzymextrakt bzw. mit dem Tyrosinaseinhibitor KCN (Abb. 9) bestätigt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Resultat eines analogen, mit dem Substrat Tyrosin durchgeführten Experimentes überein (Rast et al., 1979).

Zur Absicherung der obigen Resultate und zum evtl. Nachweis weiterer Phenoloxidasen wurde die Proteinfraktion der Sporen durch Diskelektrophorese aufgetrennt und enzymspezifischen Tests unterworfen (vgl. Abb. 10).

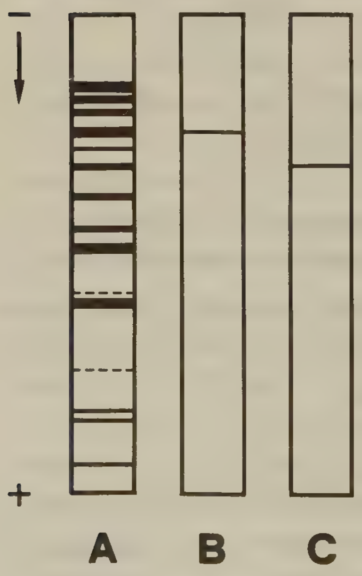


Abb. 10: Proteinmuster und Phenoloxidasen gelelektrophoretisch getrennter Rohextrakte aus Sporen von A. bisporus.
A Gesamtproteinnachweis
B Tyrosinase
C Peroxidase
Für nähere Angaben s. II.11.

Bei der Inkubation der Gele in gesättigter Tyrosinlösung zeigte sich erst nach mehreren Stunden eine deutliche Bande. Beim Peroxidasenachweis trat in der startnäheren Gelhälfte eine sehr starke, vermutlich durch Katalaseaktivität bedingte Blasenbildung auf; durch Präinkubation der Gele in 3-Amino-1,2,4-triazol - einem spezifischen Katalaseinhibitor - konnte die Gasentwicklung reduziert werden. Auf starke Katalaseaktivität von Champignonsporen ist bereits früher hingewiesen worden (Lendenmann, 1978). Für die Bedeutung von Tyrosinase und/oder Peroxidase bei der Biogenese von Melanin in den Sporen von A. bisporus s. Diskussion.

3.3. In vitro Synthese von Melanin aus γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol unter Verwendung von Phenoloxidase aus A. bisporus

Nachdem die bisherigen Ergebnisse (Akkumulation von GHB in Lamellen, Existenz aktiver Phenoloxidase in den Sporen, extrem hoher Stickstoffgehalt des nativen Melanins: vgl. Abb. 2 und 10 sowie Tab. 6) gezeigt hatten, dass GHB sehr wohl der Präkursor des Sporenwandmelanins sein könnte, wurde aus diesem Phenol mit Hilfe von Tyrosinase aus Champignonfruchtkörpern ein synthetisches Melanin hergestellt. Dieses wurde nach den gleichen Verfahren wie das Melanin aus der Sporenwand gereinigt und analysiert.

Das GHB-Melanin ist nur in Kalilauge löslich; das Spektrum der braunen Lösung ergibt keine Maxima zwischen 300 - 700 nm, und das IR-Spektrum zeigt Banden bei 3300, 1600 und 1100 cm^{-1}. Die Resultate der Elementaranalyse (C 53,4; H 5,2; N 10,3) sind korrigiert für 29,6% Asche. Ueber die Art dieses Rückstandes sind nur Spekulationen möglich: so wäre es denkbar, dass Phosphate oder Chloride aus der Synthese bzw. der nachfolgenden Reinigung des Pigmentes (vgl. II.7.2.) nur ungenügend entfernt wurden. Die korrigierten Werte stimmen mit den theoretischen Werten für GHB-Melanin (C 55,5; H 5,9; N 11,8) recht gut überein.

Nach Degradation des synthetischen Melanins durch Alkalischmelze konnte

dünnschichtchromatographisch und durch Farbreaktionen die Existenz von mindestens vier, nicht weiter analysierten Phenolen nachgewiesen werden.

3.4. Vergleich von nativem und synthetischem Champignonmelanin

Obwohl die IR-Spektren von Melaninen wenig Information über die Detailstruktur dieser Makromoleküle liefern, können sie doch für die Charakterisierung des Melanintyps nützlich sein. Wie aus Abb. 11 ersichtlich, sind die Spektren von nativem und synthetischem Melanin praktisch identisch.

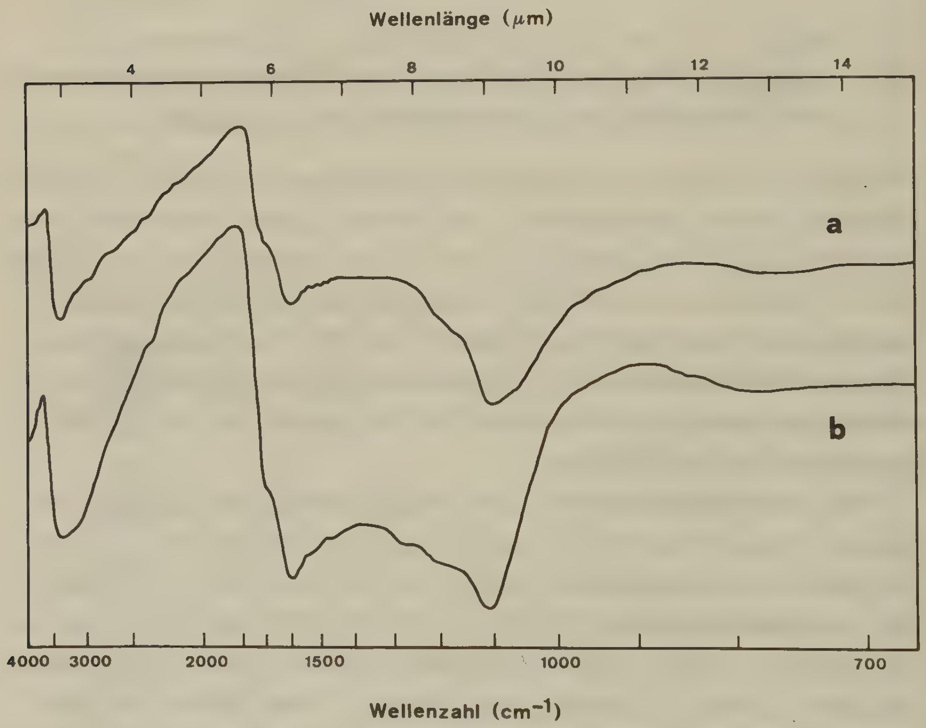


Abb. 11: IR-Spektren von Melaninen.
a) synthetisches Melanin aus γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol
b) Melanin aus der Sporenwand von A. bisporus

Tab. 6: Vergleich der Eigenschaften von Sporenwandmelanin aus A. bisporus und von synthetischem Melanin aus γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol.

geprüfte Eigenschaft		Sporenwandmelanin	synth. GHB-Melanin
Löslichkeit in	HCl	-	-
	KOH	+	+
	org. Lösungsmitteln	-	-
Elementarzusammensetzung		C 57,0; H 3,8; N 8,8; S 3,1	C 53,4; H 5,2; N 10,3

Auch Tab. 6 zeigt die grosse Aehnlichkeit der beiden Pigmente. Sie zeigen gleiches Löslichkeitsverhalten und bezüglich der Elementaranalyse weitgehende Uebereinstimmung. Der hohe Stickstoffgehalt weist auf eine besondere Art des Monomeren hin (vgl. hierzu Diskussion).

IV. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND DISKUSSION

Eine Besonderheit und kausale Ursache der Keimruhe der Sporen von A. bisporus ist die sehr starke Beeinträchtigung der Fähigkeit zur Oxidation von Succinat (Rast et al., 1976b). Das Brechen der Keimruhe erfolgt durch flüchtige, von wachsenden Hyphen des gleichen Organismus abgegebene Stoffe (Lösel, 1964), worunter insbesondere die Isovaleriansäure als ein Trigger identifiziert wurde (Rast und Stäuble, 1970; Stäuble und Rast, 1971). Luft aus Champignonkulturräumen ist nur nach Entfernung von (metabolischem) CO_2 keimungsstimulierend (Lösel, 1964); bei der optimalen Keimtemperatur geben ruhende Sporen selbst auch vergleichbare Mengen von CO_2 ab (Lendenmann, 1978). Aufgrund dieser Beobachtung sowie der naheliegenden Annahme, dass CO_2 innerhalb der sehr dicken Sporenwand von A. bisporus (Rast und Hollenstein, 1977) zumindest vorübergehend akkumuliert, muss CO_2 in diesem Organismus in der Terminologie von Sussman und Halvorson (1966) als ein Selbsthemmer der Keimung bezeichnet werden. Nach den Untersuchungen von Rast et al. (1979) beruht die beobachtete Autoinhibition der Sporen auf einer Hemmung der Succinatdehydrogenase durch in der Pyruvatcarboxylase-Reaktion synthetisiertes Oxalacetat; bei der Aktivierung der Sporen durch Isovaleriansäure erfolgt eine Metabolisierung des Triggers unter Bildung von β-Methylcrotonyl-CoA, das unter CO_2-Verbrauch in β-Methylglutaconyl-CoA transformiert wird. Bei der nunmehr auftretenden Kompetition von Pyruvatcarboxylase und β-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase um das gemeinsame Substrat ist die letztere wegen ihrer höheren Affinität zum HCO_3^- begünstigt (vgl. Scrutton und Utter, 1967), was eine Unterbindung der Bildung von hemmendem Oxalacetat bewirkt.

Eine von dieser Hypothese zur Induktion der Keimruhe in Champignonsporen abweichende Auffassung haben Weaver et al. (1968, 1970, 1972), Vogel und Weaver (1972) sowie Vogel et al. (1974) präsentiert. Danach erfolgt die Selbsthemmung der Sporen durch γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol (GHB) und/oder γ-L-Glutaminyl-3,4-benzochinon (GBQ). Diese Annahme stützt sich vor allem auf die Beobachtung, dass GBQ in

Mitochondrien aus Rattenleber die Succinatdehydrogenase hemmt, und dass die Aktivität der Succinatdehydrogenase von Mitochondrien aus jungen Champignons durch die farbigen, GBQ enthaltenden Ueberstände von Extrakten aus Lamellen älterer Fruchtkörper reduziert wird (vgl. Einleitung).

Widersprüche und Ungereimtheiten in den oben erwähnten Publikationen, theoretische Ueberlegungen sowie die experimentellen Resultate der vorliegenden Arbeit sprechen entschieden gegen eine in vivo Hemmung der Succinatdehydrogenase durch GHB oder GBQ. So wird einerseits GBQ als Enzyminhibitor bezeichnet (Weaver et al., 1970; Weaver et al., 1972), andererseits dem Präkursor des Chinons, dem GHB, diese Rolle zugeschrieben (Vogel und Weaver, 1972), und in einer späteren Publikation diesem auch gleich wieder jegliche Hemmwirkung abgesprochen (Vogel et al., 1974). Bei den in vitro Versuchen zur Hemmung von Enzymen gelangten bei der Bestimmung der GBQ-Konzentrationen falsche Bezugsgrössen zur Anwendung: nach Weaver et al. (1972) ist $\varepsilon_{490} = 10000$, während Vogel et al. (1974) als Berechnungsgrundlage für den Extinktionskoeffizienten Angaben von Weaver (1969) heranziehen. In dieser Arbeit wird das Molekulargewicht von GBQ mit 530 angegeben - tatsächlich beträgt es aber 252. RNA-Polymerase (Vogel et al., 1974) sowie verschiedene Dehydrogenasen (Weaver et al., 1970) werden durch GBQ stark gehemmt, und die betreffende Autorengruppe hat deshalb das Chinon als "hervorragendes Agens zur Hemmung von SH-abhängigen Enzymen" bezeichnet. Ferner ist die Inhibition der Succinatdehydrogenase durch GBQ irreversibel (Weaver et al., 1968). Da durch eigene Experimente mit Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase aus Hefe (vgl. II.10.4.) - unter Einsetzung von $\varepsilon_{490} = 10000$ zur Berechnung der GBQ-Konzentration (s. oben) - die starke Hemmwirkung des Benzochinons bestätigt werden konnte, sind die diesbezüglichen Resultate der Weaver-Gruppe cum grano salis wohl richtig, die beobachtete unspezifische und irreversible Inhibition vieler Enzyme durch GBQ sowie die Fakten, dass Phenole sehr leicht zu hochreaktiven Chinonen oxidiert werden (Loomis und Battaile, 1966), und dass diese starke, zu Polymerisation neigende Oxi-

dationsmittel darstellen, die leicht mit SH- oder NH_2-Gruppen von Proteinen unter Bildung von kovalenten Bindungen reagieren oder funktionelle Gruppen an Proteinen oxidieren (Loomis, 1974; Van Sumere et al., 1975), lassen es aber eo ipso als höchst fraglich erscheinen, dass GBQ die im zugesprochene Rolle bei der Induktion der Keimruhe spielen könnte. Die eigenen Analysen (Tab. 1, Abb. 4) zeigen zudem, dass bei der Extraktion von Hut-, Stiel- oder Lamellengewebe mit Wasser bei Zimmertemperatur wohl grosse Mengen des Benzochinons gebildet werden (wahrscheinlich durch quantitative Oxidation von GHB und GDHB), nach Inkubation frisch gepflückter, intakter Fruchtkörper in einer HCN-Atmospäre (vollständige Hemmung der Tyrosinase bewirkend) und anschliessender Homogenisierung in Wasser jedoch kein GBQ auftritt (vgl. III. 1.2.). Demnach muss angenommen werden, dass es sich bei dem in wässerigen Extrakten auftretenden GBQ um einen Aufarbeitungsartefakt handelt, der durch Aufhebung der in vivo existierenden, subtilen, bisher in keinem Fall genau bekannten Kompartimentierung zwischen Phenoloxidasen und Substrat sowie nachfolgender Oxidation von GHB zu GBQ und weiteren Pigmenten zustande kommt. Dieser Befund wird untermauert durch Untersuchungen von Latché (1963), wonach in wässerigen Extrakten von Champignonfruchtkörpern kein GHB auftritt und durch die folgenden Zitate der Weaver-Gruppe selbst: 'quinone formation occurs rapidly after the tissue is macerated, indicating that the phenolic precursor and the oxidizing enzyme are physically segregated in the gill cells', und 'the inhibitory potency is associated with a red pigment formed in copious amounts in the extracts of gill tissue in air, but not under anaerobic conditions' (Weaver et al., 1970; Weaver et al., 1972).

Hinweise über andere mögliche physiologische Funktionen der Phenole ergaben sich aus Untersuchungen über die Verteilung und das Vorkommen von GHB bzw. GDHB im Kulturchampignon. Wie die in Abb. 2 dargestellten Resultate augenfällig zeigen, akkumuliert das auf kurzkompostiertem Pferdedung gezogene Mycelium beträchtliche Mengen von GHB, während bei Wachstum auf Vollmedium in Schüttelkulturen nur Spuren des Phenols vorhanden sind. Da GHB selbst keinen Bestandteil

des unbewachsenen Kompostes darstellt (s. III.1.1.), bei der biologischen Degradation von Lignin aber Verbindungen wie Vanillinsäure, Coniferylalkohol und Ferulasäure auftreten (Higuchi, 1971), besteht prinzipiell die Möglichkeit, dass GHB ein Detoxifikationsprodukt für beim Abbau von Kompostsubstrat durch A. bisporus anfallende Aromate darstellt.

Informationen über die Herkunft des phenolischen Teiles von GHB waren aus dem Studium der Biogenese dieser Substanz zu erwarten (vgl. Tab. 3 und 4). Aus den Beobachtungen, dass nach Applikation von ^{14}C-Glucose bzw. ^{14}C-Shikimisäure 69 bzw. 99% der in GHB eingebauten Radioaktivität im Hydrolyseprodukt p-Aminophenol vorliegen, während Acetat praktisch nicht in den aromatischen Ring eingebaut wird, folgt eindeutig, dass dieser dem Shikimisäureweg entstammt. Als direkte Vorstufen der Seitenkette fungieren wahrscheinlich sowohl Glutaminsäure und Glutamin als auch Pyrrolidoncarbonsäure. Ueber die Art der Verknüpfung von Ring und Seitenkette sind nur Spekulationen möglich. So wäre es denkbar, dass - analog dem von Towers (1976) vorgeschlagenen Biogeneseweg für Agaritin (s. Einleitung) - aus Chorisminsäure und Glutamin p-Aminobenzoesäure entsteht und diese, nach Decarboxylierung und anschliessender Hydroxylierung, mit der γ-Carboxylgruppe von Glutaminsäure zum GHB-Molekül reagiert (vgl. Abb. 12). Da A. bisporus den aromatischen Ring von GHB also selbst zu synthetisieren vermag, kann dieses kein oder nicht ausschliesslich ein Detoxifikationsprodukt für Kompostaromate darstellen. Dass die Radioaktivität der als Modellmoleküle für bei der Lignindegradation anfallende Produkte ausgewählten Tracersubstanzen Benzoesäure und Phenol - beide ^{14}C-ringmarkiert - praktisch ausschliesslich in die Seitenkette inkorporiert wird, steht mit diesem Schluss in Einklang.

Champignonmycelium synthetisiert aus Acetat Glutaminsäure (vgl. Stäuble, 1972) sowie Pyrrolidoncarboxylat (s. Abb. 8). Hieraus kann gefolgert werden, dass auch in A. bisporus die von E. coli (Bernfield und Nestor, 1968) und Rattenleber (Niwaguchi et al., 1965) beschriebene Glutamatzyklotransferase-Reaktion, bei der aus 5-Oxoprolin Glutamin-

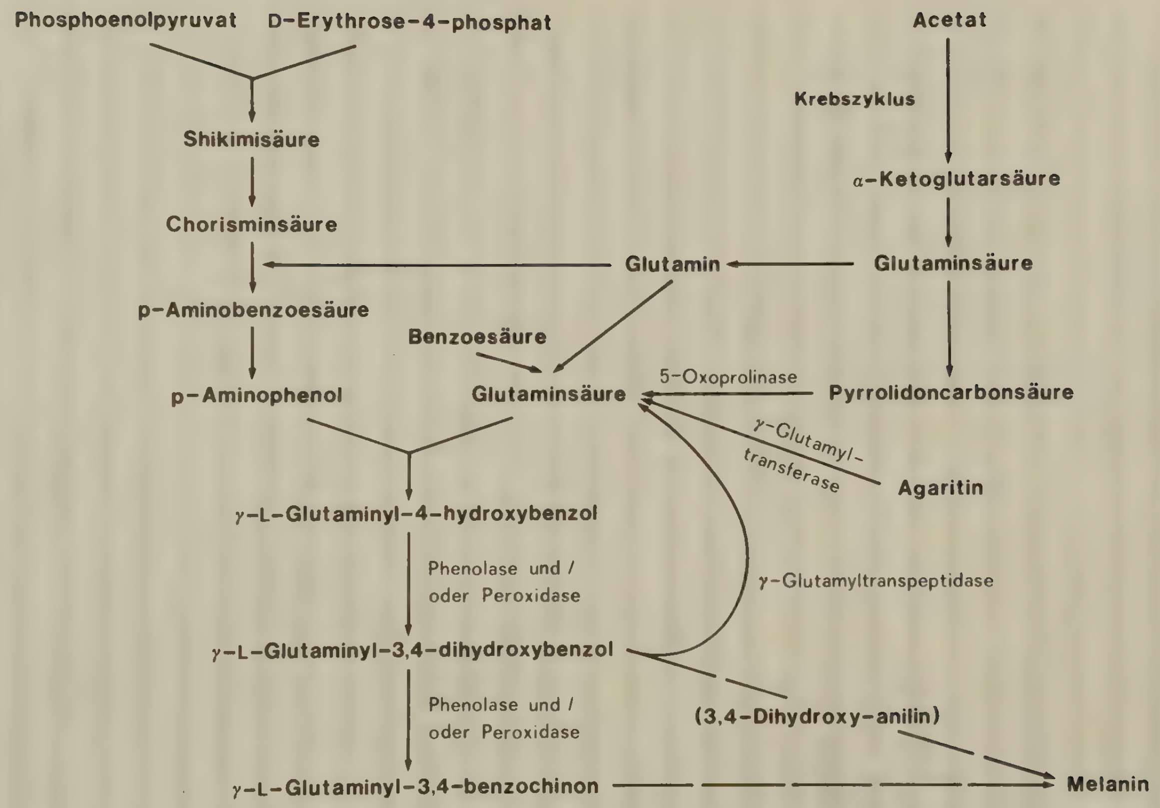


Abb. 12: Biosynthese von γ-Glutamylderivaten im Fruchtkörper von A. bisporus

säure synthetisiert wird, auftritt. Da 5-Oxoprolin in sämtlichen Entwicklungsstadien des Kulturchampignons vorkommt und von diesem metabolisiert wird (vgl. Tab. 3 und 4), ergibt sich die Möglichkeit der Existenz des γ-Glutamylzyklus (vgl. Einleitung) auch in A. bisporus. Tatsächlich sind im Fruchtkörper die getesteten zwei Schlüsselenzyme des γ-Glutamylzyklus, γ-Glutamyltranspeptidase und 5-Oxoprolinase, vorhanden (s. Tab. 5). Die letztere erwies sich zwar als sehr wenig aktiv, was jedoch auf die gewählten Testbedingungen (vgl. II.10.2.) zurückzuführen sein dürfte, denn das Reaktionsprodukt ^{14}C-Glutaminsäure erfährt ja durch andere im Rohextrakt enthaltene Enzyme, vor allem durch Glutamatzyklotransferase, eine weitere Transformation, wobei wieder 5-Oxoprolin entstehen könnte. Für die γ-Glutamyltranspeptidase wurde ein wesentlich höherer Substratumsatz gemessen; die beobachtete Reduktion dieses Wertes um lediglich 50% bei Ansätzen ohne den exogenen Glutaminsäureakzeptor Glycylglycin beruht wahrscheinlich auf der Anwesenheit von Aminosäuren im Rohextrakt, insbesondere dem als guten Glutamylakzeptor (vgl. Mooz und Wigglesworth, 1976) bekannten Cystein (s. II.9.2. und Le Roux, 1968) sowie auf der Tatsache, dass sowohl Wasser (Thompson et al., 1964) als auch das verwendete Substrat γ-Glutamyl-p-nitroanilid selbst (Tate und Meister, 1974) als Akzeptor fungieren können.

Die sehr hohe Aktivität von γ-Glutamyltranspeptidase - ca. achtmal höher als diejenige von Hefe (Mooz und Wigglesworth, 1976) - lässt es demnach als durchaus denkbar erscheinen, dass der γ-Glutamylzyklus auch in A. bisporus existiert. Möglicherweise spielt das Enzym in diesem Organismus aber auch eine speziellere Rolle (s. unten). Die ebenfalls aus Champignonfruchtkörpern isolierte γ-Glutamyltransferase (Gigliotti und Levenberg, 1964) kann wegen ihrer unterschiedlichen, restriktiveren Substratspezifität nicht mit γ-Glutamyltranspeptidase identisch sein.

Diese hier präsentierte Hypothese über eine Bildung des Sporenwandmelanins von A. bisporus aus GHB - im Shikimisäureweg entstanden (vgl. Tab. 3 und 4) - beruht auf folgenden analytischen Ergebnissen

und Erwägungen: (1) GHB, ein Phenol und potentieller Melaninpräkursor, wird in den Lamellen - dem Bildungsort der Sporen - in beträchtlichem Ausmass angehäuft, in den Sporen selbst verschwindet es jedoch fast gänzlich (vgl. Abb. 3). (2) Das native, aus der Sporenwand von A. bisporus isolierte Melanin und das künstliche, aus GHB mit Phenoloxidasen aus dem Champignon hergestellte Pigment sind sehr ähnlich (weitgehende Uebereinstimmung bei der Elementaranalyse, gleiches Löslichkeitsverhalten, praktisch identisches IR-Spektrum: vgl. Abb. 11 und Tab. 6). (3) Die Champignonsporen enthalten für die Biogenese von Melanin erforderliche Phenoloxidasen (Swan, 1974), nämlich Tyrosinase und Peroxidase (Abb. 10), und der potentielle Melaninpräkursor GHB wird durch eine Phenolase aus Sporen oxidiert (Abb. 9). (4) GDHB - das erste Intermediärprodukt der Oxidation - tritt im vegetativen Mycelium aus Kompost überhaupt nicht auf und im Fruchtkörper zuerst in sehr geringer Menge, erfährt bei der Sporenreifung jedoch plötzlich eine sprunghafte Konzentrationszunahme (s. Tab. 2). (5) Bei der in vitro Synthese von Melanin (s. III. 3. 3.) aus GHB werden GDHB und GBQ gebildet (vgl. Abb. 6). Unabhängig davon, ob die Oxidation von GDHB auch in vivo über GBQ erfolgt (vgl. Abb. 12), wird dieses höchstens als kurzlebiges, instabiles Zwischenprodukt auftreten, was mit der Beobachtung übereinstimmt, dass das Chinon im Kulturchampignon nicht in substantiellen Mengen vorkommt (vgl. III. 1. 2.). Wie die vorliegenden Resultate zeigen, wird die Biogenese von Melanin aus GHB durch Phenolase und/oder Peroxidase und Bildung von GDHB eingeleitet (s. Abb. 12). Von diesem kann γ-Glutamyltranspeptidase, im Fruchtkörper durch hohe Aktivität ausgezeichnet (gemessen mit dem von GHB nur durch die NO_2-Gruppe verschiedenen Substrat γ-Glutamyl-p-nitroanilid), Glutaminsäure abspalten und so ein reaktives Zwischenprodukt, 3,4-Dihydroxyanilin, freisetzen, das durch Phenoloxidasen sehr schnell zu einem Chinon oxidiert und - in Analogie zur Ligninbiosynthese (vgl. Brown, 1964) - nicht-enzymatisch zum Melanin polymerisiert wird. Dem GHB käme demnach bei der Biosynthese des Sporenwandmelanins die Rolle eines relativ wenig reaktionsfähigen phenolischen Speichermoleküls für

das eigentliche Monomer, 3,4-Dihydroxy-anilin, zu. Dass bereits p-Aminophenol durch Phenolase viel schneller oxidiert wird als GHB (Stüssi, unveröffentlicht), und dass o-Chinone sehr leicht mit NH_2-Gruppen reagieren, wobei komplexe Makromoleküle entstehen können (vgl. Van Sumere et al., 1975), steht mit dieser Hypothese im Einklang. Ferner ist das Vorliegen eines Mischpolymers, zusammengesetzt aus GHB- und Aminophenol-Einheiten, nicht auszuschliessen. Der beobachtete hohe N-Gehalt von nativem Melanin (s. unten) steht nicht in Widerspruch zu diesen Ueberlegungen, da sowohl reines GHB- als auch reines Aminophenol-Melanin, oder ein entsprechendes Mischpolymer, theoretisch einen N-Gehalt von rund 12% aufweisen.

Auch bei der Biogenese des Melanins von Aspergillus nidulans ist, wie der Einbau von ^{14}C-Tyrosin zeigt, der Shikimisäureweg beteiligt (Bull, 1970), während das Pigment von Alternaria sp. kein ausschliessliches Produkt dieses Weges zu sein scheint, da neben ^{14}C-Phenylalanin auch ^{14}C-Acetat inkorporiert wird (Pridham und Woodhead, 1977). Ueber die phenolischen Präkursoren der aus anderen Pilzen isolierten Melanine ist lediglich bekannt, dass bei U. maydis die potentielle Vorstufe Brenzcatechin in den Sporen angehäuft wird (Piattelli et al., 1965), dass Melanin-freie Mutanten von Verticillium dahliae bei Fütterung von 1,8-Dihydroxy-naphtalin oder der strukturell verwandten Verbindung (+)-Scytalon ähnliche Melanine wie der Wildtyp bilden (Wheeler et al., 1978), und dass in Sporen von Aspergillus niger (Swan, 1974) sowie Fruchtkörpern von Daldinia concentrica (Nicolaus, 1968) ebenfalls Naphtalinderivate als Intermediärprodukte in Frage kommen.

Zur Charakterisierung des Melanintyps dienen insbesondere der N-Gehalt und die Identität der aus der Alkalischmelze und der Oxidation mit Permanganat anfallenden Abbauprodukte. Der hier für das Sporenwandmelanin von A. bisporus festgestellte N-Gehalt von rund 9% übertrifft die Werte von anderen Pilzmelaninen weit und liegt sogar über demjenigen für Melanine aus tierischem Gewebe (6 - 7%), enthält doch das Melanin aus der Sporenwand von U. maydis 1% und dasjenige aus Mycelium von Alternaria sp. bzw. Aspergillus nidulans 2,6 resp. 4,4%

N (Piattelli et al., 1965 ; Pridham und Woodhead, 1977; Rowley und Pirt, 1972). Der N-Gehalt von Melanin aus *A. bisporus* liegt etwas unter dem theoretischen Wert für GHB-Melanin, was an den Einbau anderer Aminosäuren, z. B. von Cystein, denken lässt; dies würde auch den beobachteten S-Gehalt von 3% erklären. Dass bei der Oxidation von nativem Champignonmelanin mit $KMnO_4$ keine Pyrrolsäuren auftreten und die bei der Alkalischmelze gebildeten Abbauprodukte - Phenolcarbonsäuren und ein "neutrales" Phenol - nicht mit den bislang aus tierischen pflanzlichen oder pilzlichen Melaninen bekannten Degradationsprodukten identisch sind, spricht für eine hohe Spezifität des Melanins verschiedener Organismengruppen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. A. bisporus bildet γ-L-Glutaminyl-4-hydroxybenzol (GHB) sowohl im vegetativen Mycelium (bei Anzucht auf dem natürlichen Substrat 8 mg/g TG, nur Spuren in Flüssigkulturen mit Pepton/Hefe/Glucose) als auch in allen Teilen des Fruchtkörpers, wobei in den Lamellen eine Akkumulation des Phenols (auf ca. 20 mg/g TG) stattfindet. Während GHB in sämtlichen Entwicklungsstadien dieses Pilzes auftritt, findet sich sein Oxidationsprodukt γ-L-Glutaminyl-3,4-dihydroxybenzol (GDHB) ausschliesslich in Sporokarpen und stellt somit eine für diese charakteristische Substanz dar. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen dem zeitlichen Verlauf der Sporenbildung und -reifung einerseits und der Konzentrationszunahme des Diphenols andererseits.

2. γ-L-Glutaminyl-3,4-benzochinon (GBQ) tritt im Kulturchampignon höchstens als kurzlebiges Intermediärprodukt der Melaninbiogenese auf (s. unten). Sein quantitativ bedeutendes Vorkommen in Homogenaten aus Fruchtkörpern stellt einen Extraktions- und Aufarbeitungsartefakt dar.

3. Bestimmung der Verdünnungsfaktoren und Markierungsmuster von GHB nach Applikation einer Reihe von Tracersubstanzen zeigen, dass der Benzolring dieser Verbindung via Shikimisäureweg gebildet wird; als Vorstufen der Seitenkette fungieren sowohl Glutaminsäure und Glutamin als auch Pyrrolidoncarbonsäure. Der aromatische Ring von Benzoesäure resp. Phenol wird nicht direkt in GHB inkorporiert, kann aber - nach Spaltung - das C-Gerüst für die Seitenkette liefern.

4. 5-Oxoprolin wird in sämtlichen Entwicklungsstadien des Pilzes gebildet und steht mit Glutaminsäure in einem reversiblen metabolischen Gleichgewicht. Extrakte aus Fruchtkörpern zeigen 5-Oxoprolinase- und γ-Glutamyltranspeptidaseaktivität. Die chemischen und enzymologischen Analysen erlauben es, die Existenz des γ-Glutamylzyklus auch in A. bisporus zu postulieren. Die enge Strukturanalogie zwischen dem hier zum Nachweis der γ-Glutamyltranspeptidase verwendeten Testsubstrat

γ-L-Glutamyl-p-nitroanilid und GHB zeigt an, dass diesem Enzym eine zusätzliche, speziellere Rolle im Stoffwechsel dieses Pilzes zukommen könnte, nämlich diejenige eines Starterenzyms für die Melaninbiogenese.

5. Das Melanin der Champignonsporenwand ist durch seine KOH-Löslichkeit und den hohen N-Gehalt ausgezeichnet; es ist dem aus GHB unter Verwendung von Phenoloxidase aus A. bisporus synthetisierten Melanin auch bezüglich anderer Eigenschaften (z.B. des IR-Spektrums) sehr ähnlich. Wahrscheinlich fungiert GHB bei der Biogenese des Polymers als Speichersubstanz für reaktionsfähigere Aminophenole, die durch γ-Glutamyltranspeptidase von GDHB abgespalten und durch Tyrosinase und/oder Peroxidase zum Melanin oxidiert werden.

6. Die experimentellen Resultate werden speziell in bezug auf ihre Bedeutung für die Induktion der Keimruhe und die Biosynthese von Melanin in Champignonsporen diskutiert.

DANK

Frau Prof. Dr. D. Rast möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen für die wertvollen Ratschläge bei der Durchführung der Versuche, die lehrreichen Fachgespräche und das stete Interesse am Fortschreiten dieser Arbeit.

Ferner danke ich den Herren Prof. W. v. Philipsborn und H. Frohofer für die Ausführung analytischer Untersuchungen.

Die vorliegende Arbeit wurde dank der finanziellen Beiträge des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekt 3.001-076) und der Pilzlieferungen durch die Firma Hauser, Champignonkulturen, Gossau, ermöglicht.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Albro, P.W. and Moore, B.: Identification of the metabolites of simple phthalate diesters in rat urine. J. Chrom. 94, 209-218 (1974)

Altamura, M.R., Andreotti, R.E., Bazinet, M.L. and Long, L.: Pyroglutamyl dipeptides in mushroom, Agaricus campestris. J. Food Sci. 35, 134-139 (1970)

Andrews, R.S. and Pridham, J.B.: Melanins from DOPA-containing plants. Phytochem. 6, 13-18 (1967)

Asakawa, Y. and Genjida, F.: Phthalic esters included in commercial solvents and those eluted from laboratory apparatus. J. Sci. Hiroshima Univ. 34, 103-108 (1970)

Bernfield, M.R. and Nestor, L.: The enzymatic conversion of glutaminyl-tRNA to pyrrolidone carboxylate-tRNA. Biochem. Biophys. Res. Comm. 33, 843-849 (1968)

Berry, S.K. and Gramshaw, J.W.: The presence of trace amounts of plasticisers in chemical reagents. Chem. Ind. 459 (1974)

Biston, R., Casimir, J. et Renard, M.: Dosage densitométrique du L(+)-γ-(p-hydroxy)anilide de l'acide glutamique. Prot. Biol. Fluids 9, 109-112 (1961)

Bray, G.A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. Anal. Biochem. 1, 279-285 (1960)

Brown, S.A.: Lignin and tannin biosynthesis. In: Harborne, Biochemistry of phenolic compounds, London and New York, Academic Press 1964

Bull, A.T.: Chemical composition of wild-type and mutant Aspergillus nidulans cell walls. The nature of polysaccharide and melanin constituents. J. Gen. Microbiol. 63, 75-94 (1970)

Casimir, J., Jadot, J. et Renard, M.: Séparation et caractérisation de la N-éthyl-γ-glutamine à partir de Xerocomus badius. Biochim. Biophys. Acta 39, 462-468 (1960)

Demoulin, V.: Propositon d'un processus de détection des phénoloxydases et peroxydases chez les macromycetès. Application à quelques Gastéromycetès. Planta 76, 129-137 (1967)

Determann, W. und Walter, I.: Source of aromatic affinity to "Sephadex" dextran gels. Nature 219, 604-605 (1968)

Dütsch, G.A.: Biogenese von Mannit und ihre physiologische Bedeutung in Agaricus bisporus. Dissertation, Universität Zürich (1971)

Dütsch, G.A., Schatzmann, H. and Rast, D.: A synthetic medium for the submerged growth of Agaricus bisporus (in Vorbereitung)

Gelotte, B.: Studies on the gel filtration. Sorption properties of the bed material Sephadex. J. Chrom. 3, 330-342 (1960)

Gigliotti, H.J. and Levenberg, B.: Studies on the γ-glutamyltransferase of Agaricus bisporus. J. Biol. Chem. 239, 2274-2284 (1964)

Gmelin, R., Luxa, H., Roth, K. and Höfle, G.: Dipeptide precursor of garlic odour in Marasmius species. Phytochem. 15, 1717-1721 (1976)

Hackman, R.H. and Goldberg, M.: Microchemical detection of melanins. Anal. Biochem. 41, 279-285 (1971)

Haslam, E., Haworth, R.D. and Knowles, P.F.: The biosynthesis of gallic acid. J. Chem. Soc. 1854-1859 (1961)

Häsler-Küng, D.: Die Phenoloxidasen von Agaricus bisporus. Dissertation, Universität Zürich (1974)

Häsler-Küng, D. und Rast, D.: Enzymologie des Holzabbaus durch Agaricus bisporus: Bildung von Phenoloxidasen. Material und Organismen 9, 35-50 (1974)

Heinemann, P. et Casimir, J.: Distribution des acides aminés libres dans le genre Agaricus Fr. sensu stricto (= Psalliota). Rev. Mycol. 24, 24-33 (1961)

Higuchi, T.: Formation and biological degradation of lignins. Adv. Enzymology 34, 207-283 (1971)

Hollenstein, G.: Ultrastruktur und Chemie der Sporenwand von Agaricus bisporus. Diplomarbeit, Universität Zürich (1975)

Holtz, R.B. and Schisler, L.C.: Lipid metabolism of Agaricus bisporus (Lange) Sing.: I. Analysis of sporophore and mycelial lipids. Lipids 6, 176-180 (1971)

Horowitz, N.H., Fling, M. and Horn, G.: Tyrosinase (Neurospora crassa). In: Colowick and Kaplan, Methods in Enzymology, Vol. 17 A, New York and London, Academic Press 1970

Iwami, K., Yasumoto, K., Nakamura, K. and Mitsuda, H.: Reactivity of Lentinus γ-glutamyltransferase with lentinic acid as the principal endogenous substrate. Agr. Biol. Chem. 39, 1941-1946 (1975)

Jadot, J., Casimir, J. et Renard, M.: Séparation et caractérisation du L(+)-γ-(p-hydroxy)anilide de l'acide glutamique à partir de Agaricus hortensis. Biochim. Biophys. Acta 43, 322-328 (1960)

Johnston, L.B. and Hamill, M.M.: The non-volatile organic acids of some fresh fruits and vegetables. Can. Inst. Food Technol. J. 1, 3-5 (1968)

Latché, J.C.: Acides aminés libres des différentes parties du carpophore d'Agaricus hortensis. Incidence sur la formation enzymatique de glycocolle par transamination. C. R. Acad. Sc. Paris 257, 2145-2147 (1963)

Lendenmann, J.: Vorkommen und Bedeutung von Mannit, Trehalose und Glycogen in Sporen und Mycelium von Agaricus bisporus. Dissertation, Universität Zürich (1978)

Le Roux, P.: Métabolisme des acides organiques dans les carpophores d'Agaricus campestris. Mushroom Science 5, 525-539 (1962)

Le Roux, P.: Action du gaz carbonique sur le métabolisme du carpophore d'Agaricus bisporus. I. Les acides organiques et les acides aminés libres. Mushroom Science 7, 31-36 (1968)

Levenberg, B.: Structure and enzymatic cleavage of agaritine, a phenylhydrazide of L-glutamic acid isolated from Agaricaceae. J. Am. Chem. Soc. 83, 503-504 (1961)

Loomis, W.D.: Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. In: Colowick and Kaplan, Methods in Enzymology, Vol. 31, New York and London, Academic Press 1974

Loomis, W.D. and Battaile, J.: Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. Phytochem. 5, 423-438 (1966)

Lösel, D.M.: The stimulation of spore germination in Agaricus bisporus by living mycelium. Ann. Bot. N. S. 28, 541-554 (1964)

Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

Maurer, H.R.: Disk-Elektrophorese. Berlin, Walter de Gruyter 1968

Meister, A.: Biochemistry of the amino acids. Vol. I. New York and London, Academic Press 1965

Meister, A.: On the enzymology of amino acid transport. Science 180, 33-39 (1973)

Meister, A. and Tate, S.S.: Glutathione and related γ-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. Ann. Rev. Biochem. 45, 559-604 (1976)

Mooz, E.D. and Wigglesworth, L.: Evidence for the γ-glutamyl cycle in yeast. Biochem. Biophys. Res. Comm. 68, 1066-1072 (1976)

Nicolaus, R.A.: Melanins. Paris, Hermann 1968

Nicolaus, R.A., Piattelli, M. and Fattorusso, E.: The structure of melanins and melanogenesis - IV. On some natural melanins. Tetrahedron 20, 1163-1172 (1964)

Niwaguchi, T., Motohashi, N. and Strecker, H.J.: The metabolic conversion of L-glutamate to pyrrolidone carboxylate in rat tissue. Biochem. Z. 342, 469-484 (1965)

Piattelli, M., Fattorusso, E., Magno, S. and Nicolaus, R.A.: The structure of melanins and melanogenesis - III. The structure of sepiomelanin. Tetrahedron 19, 2061-2072 (1963)

Piattelli, M., Fattorusso, E., Nicolaus, R.A. and Magno, S.: The structure of melanins and melanogenesis - V. Ustilagomelanin. Tetrahedron 21, 3229-3236 (1965)

Piquemal, M., Baldy, P., Serres, M. et Latché, J.C.: Etude, en fonction du temps de croissance, de quelques constituants du mycélium d'Agaricus bisporus Lge, cultivé sur milieu semi-synthétique. C. R. Acad. Sc. Paris 271, 2316-2319 (1970)

Piquemal, M., Latché, J.C. et Baldy, P.: Importance de l'acide glutamique dans la nutrition et le métabolisme d'Agaricus bisporus Lge. Mushroom Science 8, 413-424 (1972)

Pomerantz, S.H. and Peh-Chen Li, J.: Tyrosinases (Hamster melanoma). In: Colowick and Kaplan, Methods in Enzymology, Vol. 17 A, New York and London, Academic Press 1970

Potgieter, H.J. and Alexander, M.: Susceptibility and resistance of several fungi to microbial lysis. J. Bact. 91, 1526-1532 (1966)

Pridham, J.B. and Woodhead, S.: The biosynthesis of melanin in Alternaria. Phytochem. 16, 903-906 (1977)

Rast, D.: Zur stoffwechselphysiologischen Bedeutung von Mannit und Trehalose in Agaricus bisporus. Planta 64, 81-93 (1965)

Rast, D.: Translokation von Mannitol im Fruchtkörper von Agaricus bisporus. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 76, 176-184 (1966)

Rast, D. and Stäuble, E.J.: On the mode of action of isovaleric acid in stimulating the germination of Agaricus bisporus spores. New Phytol. 69, 557-566 (1970)

Rast, D., Greuter, B., Lendenmann, J. and Zobrist, P.: The biochemistry of dormancy and germination of the Agaricus bisporus spore. Mushroom Science 9, 59-75 (1976a)

Rast, D., Stäuble, E.J. and Zobrist, P.: The Krebs cycle and control of dormancy in the Agaricus bisporus spore. New Phytol. 76, 469-477 (1976b)

Rast, D. and Hollenstein, G.O.: Architecture of the Agaricus bisporus spore wall. Can. J. Bot. 55, 2251-2262 (1977)

Rast, D., Stüssi, H. and Zobrist, P.: On the self-inhibition of the Agaricus bisporus spore by γ-glutaminyl-4-hydroxybenzene, γ-glutaminyl-3,4-benzoquinone, and CO_2. Physiol. Plant. (im Druck)

Rowley, B.I. and Pirt, S.J.: Melanin production by Aspergillus nidulans in batch and chemostat cultures. J. Gen. Microbiol. 72, 553-563 (1972)

Saunders, B.C., Holmes-Siedle, A.G. and Stark, B.P.: Peroxidase. London, Butterworths 1964

Scrutton, M.C. and Utter, M.F.: Pyruvate carboxylase. IX. Some properties of the activation by certain acyl derivatives of coenzyme A. J. Biol. Chem. 242, 1723-1735 (1967)

Stahl, E.: Dünnschicht-Chromatographie. Berlin, Heidelberg und New York 1967

Stäuble, E.J.: Vorkommen und Stoffwechsel leichtflüchtiger Substanzen von bekannter oder vermuteter physiologischer Wirksamkeit in Agaricus bisporus. Dissertation, Universität Zürich (1972)

Stäuble, E.J. und Rast, D.: Leichtflüchtige Stoffe in Agaricus bisporus. Experientia 27, 886-888 (1971)

Sussman, A.S. and Halvorson, H.O.: Spores. Their dormancy and germination. New York and London, Harper and Row 1966

Swan, G.A.: Structure, chemistry, and biosynthesis of the melanins. Fortschr. Chem. Org. Naturst. 31, 521-582 (1974)

Szent-Gyorgyi, A., Chung, R.H., Boyajian, M.J., Tishler, M., Arison, B.H., Schoenewaldt, E.F. and Wittick, J.J.: Agaridoxin, a mushroom metabolite. Isolation, structure, and synthesis. J. Org. Chem. 41, 1603-1606 (1976)

Tahara, S. and Mizutani, J.: Carboxylic acids in cultured broth of Sporobolomyces odorus. Agr. Biol. Chem. 38, 323-328 (1974)

Tate, S.S. and Meister, A.: Interaction of γ-glutamyltranspeptidase with amino acids, dipeptides, and derivatives and analogs of glutathione. J. Biol. Chem. 249, 7593-7602 (1974)

Thompson, J.F., Turner, D.H. and Gering, R.K.: γ-Glutamyltranspeptidase in plants. Phytochem. 3, 33-46 (1964)

Touzé-Soulet, J.M. et Montant, M.C.: Les acides organiques de quelques basidiomycètes supérieurs. C. R. Acad. Sci. Paris 245, 1825-1828 (1957)

Towers, G.H.N.: Secondary metabolites derived through the shikimate-chorismate pathway. In: Smith and Berry, The filamentous fungi, Vol. 2, London, Edward Arnold 1976

Turner, W.B.: Fungal metabolites. London and New York, Academic Press 1971

Van Der Werf, P., Orlowski, M. and Meister, A.: Enzymatic conversion of 5-oxo-L-proline (L-pyrrolidone carboxylate) to L-glutamate coupled with cleavage of adenosine triphosphate to adenosine diphosphate, a reaction of the γ-glutamyl cycle. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2982-2985 (1971)

Van Sumere, C.F., Albrecht, J., Dedonder, A., De Pooter, H. and Pé, I.: Plant proteins and phenolics. In: Harborne and Van Sumere, The chemistry and biochemistry of plant proteins, London and New York, Academic Press 1975

Vogel, F.S. and Weaver, R.F.: Concerning the induction of dormancy in spores of Agaricus bisporus. Exp. Cell Res. 75, 95-104 (1972)

Vogel, F.S., McCarry, S.J., Kremer, L.A.K. and Graham, D.G.: Bacteriocidal properties of a class of quinoid compounds related to sporulation in the mushroom, Agaricus bisporus. Am. J. Path. 76, 165-174 (1974)

Weaver, R.F.: Isolation and properties of a respiratory inhibitor from the gill tissue of the sporulating common meadow mushroom (Agaricus bisporus). Ph. D. Thesis. Duke University, Durham N.C., USA (1969)

Weaver, R.F., Byrne, W.L. and Vogel, F.S.: Formation of the dormant spore in the common meadow mushroom: appearance of respiratory inhibitor(s). Fed. Proc. 27, 248 (1968)

Weaver, R.F., Rajagopalan, K.V., Handler, P., Jeffs, P., Byrne, W. L. and Rosenthal, D.: Isolation of γ-L-glutaminyl-4-hydroxybenzene and γ-L-glutaminyl-3,4-benzoquinone: a natural sulfhydryl reagent, from sporulating gill tissue of the mushroom Agaricus bisporus. Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 1050-1056 (1970)

Weaver, R.F., Rajagopalan, K.V., Handler, P., Rosenthal, D. and Jeffs, P.W.: Isolation from the mushroom Agaricus bisporus and chemical synthesis of γ-L-glutaminyl-4-hydroxybenzene. J. Biol. Chem. 246, 2010-2014 (1971a)

Weaver, R.F., Rajagopalan, K.V., Handler, P. and Byrne, W.L.: γ-L-glutaminyl-3,4-benzoquinone. Structural studies and enzymatic synthesis. J. Biol. Chem. 246, 2015-2020 (1971b)

Weaver, R.F., Rajagopalan, K.V. and Handler, P.: Mechanism of action of a respiratory inhibitor from gill tissue of the sporulating common mushroom, Agaricus bisporus. Arch. Biochem. Biophys. 149, 541-548 (1972)

Wheeler, M.H., Tolmsoff, W.J., Bell, A.A. and Mollenhauer, H.H.: Ultrastructural and chemical distinction of melanins formed by Verticillium dahliae from (+)-scytalone, 1,8-dihydroxynaphtalene, catechol, and L-3,4-dihydroxyphenylalanine. Can. J. Microbiol. 24, 289-297 (1978)

Wilkinson, J.M., Press, E.M. and Porter, R.R.: The N-terminal sequence of the heavy chain rabbit immunoglobin IgG. Biochem. J. 100, 303-308 (1966)

Yasumoto, K., Iwami, K. and Mitsuda, H.: A new sulfur-containing peptide from Lentinus edodes acting as a precursor for lenthionine. Agr. Biol. Chem. 35, 2059-2069 (1971)

Zobrist, P.: Die Bedeutung des Krebszyklus für die Keimruhe der Sporen von Agaricus bisporus. Dissertation, Universität Zürich (1975)

CURRICULUM VITAE

von Hans Stüssi, geboren am 24. Dezember 1946 in Zürich, Bürger von Dänikon ZH

1953 - 1959	Primarschule Dänikon
1959 - 1962	Sekundarschule Otelfingen
1962 - 1965	Lehre als Chemielaborant
1965 - 1967	Beschäftigt als Chemielaborant
1967 - 1970	Gymnasium Juventus Zürich. Maturitätsabschluss Typus B
1970	Immatrikulation an der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich
1975	Diplom für Naturwissenschaften
1975 - 1978	Doktorarbeit unter der Leitung von Frau Prof. Dr. D. Rast am Institut für Pflanzenbiologie. Seit 1975 Assistent am gleichen Institut

Während meines Studiums besuchte ich bei folgenden Dozenten Vorlesungen, Kurse und Praktika:

Mathematik:	Prof. E. Batschelet
Chemie:	Prof. H.R. Oswald, Prof. H. Schmid, Dr. P. Rüedi
Biochemie:	Prof. Ph. Christen, Prof. R. Humbel, Prof. J. Kägi, Prof. F. Leuthardt, Prof. Ch. Weissmann
Mikrobiologie:	Prof. R. Bachofen, PD Dr. F. Knüsel, Dr. U. Pfluger, Dr. K. Schneider
Zoologie:	Prof. H. Burla, Prof. P.S. Chen, Prof. H. Kummer, Prof. R. Nöthiger, Prof. P. Tardent, Prof. R. Wehner, Prof. V. Ziswiler
Botanik:	Prof. R. Bachofen, Prof. C.D.K. Cook, Prof. P. Endress, Prof. H.R. Hohl, Prof. D. Rast, Prof. O. Rohweder, Prof. H. Schäppi, Prof. J. Schlittler, Prof. H. Wanner, Dr. G.O. Michalenko, B. Stüssi